

Aus dem Bereich
Klinische Medizin für Urologie und Kinderurologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Validierung und Target-Identifizierung
der metastasierungsassoziierten microRNAs miR-30e-3p und miR-139-5p
zur Prognosebewertung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2018

vorgelegt von: Anna Ramona Pleyers
geb. am: 06. Januar 1991 in Aachen

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
1 Zusammenfassung	4
1.1 Deutsch	4
1.2 Englisch	5
2 Einleitung	7
2.1 Nierenzellkarzinom (NZK)	7
2.1.1 Epidemiologie	7
2.1.2 Ätiologie	9
2.1.3 Klassifikation der Nierenzellkarzinome	10
2.1.4 Pathologische Makroskopie und Mikroskopie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms	12
2.1.5 Genetik des klarzelligen Nierenzellkarzinoms	13
2.1.6 Diagnostik	14
2.1.7 Stadieneinteilung und Malignitätsgrad	15
2.1.8 Therapie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms	17
2.1.9 Metastasierung und Prognose	21
2.2 MiRNAs	26
2.2.1 Biogenese und Funktion	26
2.2.2 Regulation	29
2.2.3 Bedeutung in der Tumorgenese	29
2.2.4 Bedeutung der miRNAs im Nierenzellkarzinom	31
3 Ziele der Arbeit.....	35
4 Material und Methoden	36
4.1 Material	36
4.1.1 Biologische Materialien	36
4.1.2 Geräte und Programme	38
4.1.3 Chemikalien und Kitsysteme	38
4.1.4 Puffer und Lösungen zum Proteinnachweis	39
4.2 Methoden	41
4.2.1 Gesamt-RNA Isolierung	41
4.2.2 Gesamt-RNA Konzentrations- und Qualitätsmessung	43
4.2.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	44
4.2.4 Quantitative Echtzeit- <i>polymerase chain reaction</i> (qPCR)	46
4.2.5 Zellkulturen	48
4.2.6 Proteinnachweis	50
4.2.7 Statistische Analysen	52

5	Ergebnisse	54
5.1	Validierung der Korrelation zwischen miRNA-Expression und Metastasierung	54
5.2	Korrelation der Ergebnisse zu den klinischen Parametern	58
5.2.1	ROC-Analysen	58
5.2.2	Korrelation der Ergebnisse zum metastasierungsfreien Überleben..... mittels Kaplan-Meier-Analysen	59
5.2.3	Korrelation der miRNA-Expression zum Gesamtüberleben mittels Kaplan-Meier-Analysen	62
5.2.4	Metastasierungsrisiko bei organbegrenzten Tumoren	64
5.3	Validierung der miRNA Targets auf Proteinebene	69
5.3.1	Transiente Transfektion	69
5.3.2	Analyse der Proteinkonzentration mittels Western Blot.....	72
6	Diskussion.....	75
6.1	Validierung der prognostischen Relevanz der miR-30e-3p und miR-139-5p	75
6.2	Korrelation der miRNA-Expression zum metastasierungsfreien Überleben und Gesamtüberleben	78
6.3	Metastasierungsrisiko bei organbegrenzten Tumoren.....	80
6.4	Funktionelle Bedeutung der Targets für die miRNA miR-30e-3p auf Proteinebene	82
7	Schlussfolgerungen und Ausblick	85
8	Verzeichnisse.....	87
8.1	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	87
8.2	Abbildungsverzeichnis	98
8.3	Tabellenverzeichnis	100
8.4	Abkürzungsverzeichnis	102
9	Anhang	104
9.1	Danksagung.....	104

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsch

Das klarzellige Nierenzellkarzinom (kNZK) ist mit ca. 80-90% der häufigste bösartige Tumor der Niere. Die Prognose ist insbesondere vom Metastasierungspotential abhängig. Insgesamt weisen etwa 20% der Patienten bereits bei der Erstdiagnose eine Metastasierung auf, weitere 20% der Patienten entwickeln im Verlauf metachrone Metastasen. Dabei liegt die 5-Jahres-Überlebensrate unter 10%. Nach den aktuellen Leitlinien von 2017 wird keine Empfehlung für eine adjuvante Therapie ausgesprochen. Um eine individuelle Prognosebewertung sowie eine Verbesserung der adjuvanten Therapie und Nachsorge bei Patienten mit metastasiertem kNZK zu erreichen, sind zuverlässige molekulare Marker erforderlich. Hier haben sich in den letzten Jahren microRNAs (miRNAs) als vielversprechende Kandidaten erwiesen.

Diese kleinen einzelsträngigen RNA-Moleküle sind in der Lage, zelluläre Prozesse wie die Proliferation, Differenzierung und Apoptose zu steuern. Eine besondere Bedeutung kommt ihnen bei der Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen zu, da sie sowohl als Onkogene als auch als Tumorsuppressoren fungieren können.

In der urologischen Forschungsgruppe der Universität des Saarlandes konnte für das kNZK bei 14 miRNAs eine Expressionsänderung im Vergleich von metastasierten zu nichtmetastasierten Tumoren festgestellt werden. In dieser Arbeit wurde eine Validierung der veränderten miRNA-Expression retrospektiv an einem unabhängigen Patientenkollektiv vorgenommen.

Die Validierung der beiden miRNAs miR-30e-3p und miR-139-5p an 48 nichtmetastasierten und 54 metastasierten Proben unter Verwendung der quantitativen Echtzeit-*polymerase chain reaction* (qPCR) stellte sich als erfolgreich heraus. Es konnte bestätigt werden, dass sowohl die Expression der miR-30e-3p als auch die miR-139-5p-Expression in metastasierten Tumoren im Vergleich zu nichtmetastasierten Tumoren höchst signifikant herunterreguliert war.

Zudem sollte die prognostische Aussagekraft der miRNAs durch eine Korrelation zu den klinischen Parametern geprüft werden. Hierbei konnte anhand von Kaplan-Meier-Analysen für die miR-30e-3p ein höchst und für die miR-139-5p ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen der miRNA-Expression und dem metastasierungsfreien Überleben bestätigt werden. Zusätzlich wurde die Korrelation zwischen der miRNA-Expression und dem Gesamtüberleben der Patienten geprüft. Für die beiden untersuchten miRNAs miR-30e-3p und

miR-139-5p konnte jedoch kein signifikantes Ergebnis ermittelt werden. Auch bei den organbegrenzten Tumoren der T-Kategorie pT1 und pT2 war eine verminderte Expression der beiden miRNAs signifikant mit einem kürzeren metastasierungsfreien Überleben assoziiert.

Um weitere Erkenntnisse über die Funktionen der miRNAs im Metastasierungsprozess zu erhalten, konnten in Vorversuchen der urologischen Forschungsgruppe mittels Proteomanalysen potentielle miRNA-Targets für die miR-30a-3p identifiziert werden. Hierzu gehören die Proteine Cofilin und Nucleosid-Diphosphatkinase (NDK).

Als ein weiteres Ziel dieser Arbeit sollten diese potentiellen Targets ebenfalls für die miR-30e-3p in Zellkulturmodellen der Zelllinie 786-O überprüft werden. Die Versuche erfolgten durch transiente Transfektion der miR-30e-3p und anschließenden Proteinnachweis durch Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), Immundetektion und Western-Blot-Analysen. Die Auswertung der Ergebnisse zeigten einzeln betrachtet für die miR-30e-3p keine signifikant veränderten Proteinkonzentrationen von Cofilin oder NDK. Anschließend erfolgte eine Analyse der gesamten miR-30-Familie, welche Cofilin als potentielles Target bestätigen konnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass die beiden miRNAs miR-30e-3p und miR-139-5p zur Vorhersage des Metastasierungsrisikos dienen können. Die individuelle Prognose kann somit genauer definiert werden als in den derzeit verwendeten klinischen prognostischen Scores.

1.2 Englisch

Clear renal cell carcinoma (ccRCC) is the most frequent (about 80-90%) malignant tumor of the kidney. The prognosis depends strongly on the metastatic potential. Overall, approximately 20% of patients show metastases at the time of the initial diagnosis, another 20% develop metachronous metastases. The 5-year survival rate in metastatic patients is approximately 10%. According to the current guidelines of 2017, adjuvant therapy is not recommended. In order to achieve an individual prognostic evaluation and an improvement in adjuvant therapy and aftercare in patients with metastatic ccRCC, reliable molecular markers are required. In recent years miRNAs represent very potent candidates.

These small single-stranded RNA molecules are able to control cellular processes such as proliferation, differentiation and apoptosis. They are of particular importance in the development and progression of tumor diseases, because they can function both - as oncogene suppressors and as tumor suppressors.

The urological research group at Saarland University has already been identified expression changes of 14 miRNAs in metastatic compared to non-metastatic tumors. In this thesis the altered miRNA expression in correlation with the metastatic potential is evaluated on an independent group of patients retrospectively.

The validation in 48 non-metastatic and 54 metastatic samples using the quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) confirmed that the expression of miR-30e-3p and miR-139-5p in metastatic tumors was significantly downregulated compared to non-metastatic tumors. In addition, the prognostic significance of the miRNAs has been tested by correlating with the clinical parameters. Kaplan-Meier analysis confirmed a highly significant correlation between miRNA expression of miR-30e-3p and miR-139-5p and metastases-free survival. Furthermore the correlation between miRNA expression and overall survival of patients was examined. For the two miRNAs miR-30e-3p and miR-139-5p no significant result could be determined. A reduced expression of the two miRNAs was also significantly associated with a shorter metastasis-free survival in organ-confined tumors of the T categories pT1 and pT2.

In order to gain further insights into the functions of miRNAs in the metastatic process, potential miRNA targets for miRNA miR-30a-3p have been identified in preliminary studies of the urological research group of Saarland University using proteome analysis - including the proteins cofilin and nucleoside diphosphate kinase (NDK). A further goal of this thesis was to prove these potential targets also for miR-30e-3p in cell culture models of cell line 786-O. The experiments were carried out by transient transfection of miR-30e-3p and subsequent protein detection by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), immune detection and western blot analysis. Results did not show any significant changes in protein concentrations of cofilin or NDK for the miR-30e-3p individually. This was followed by an analysis of the entire miR-30 family, which confirmed cofilin as a potential target.

The results of this work confirm that the two miRNAs miR-30e-3p and miR-139-5p can be used to predict the risk of metastasis. The individual prognosis can thus be defined more precisely than in the currently used clinical prognostic scores.

2 Einleitung

2.1 Nierenzellkarzinom (NZK)

2.1.1 Epidemiologie

NZK machen etwa 3% aller bösartigen Tumore im Erwachsenenalter aus und sind neben dem Prostata- und Harnblasenkarzinom die dritthäufigste urologische Tumorentität (Wang et al. 2015). Das NZK ist dabei mit 80-90% der häufigste bösartige Tumor der Niere (Kurosch et al. 2014).

2.1.1.1 Inzidenz

Die Inzidenz variiert weltweit erheblich. In Afrika erkrankt 1 von 100.000 Einwohnern, wohingegen in osteuropäischen Regionen mehr als 15 von 100.000 Einwohnern erkranken (Znaor et al. 2015). In den letzten zwei Jahrzehnten wird über eine weltweit steigende Inzidenz von 2% pro Jahr berichtet (Ljungberg et al. 2011). Innerhalb der europäischen Union traten im Jahr 2012 insgesamt 84.400 neue Erkrankungsfälle mit 34.700 Todesfällen auf (Ljungberg et al. 2015). In Deutschland wurden im Jahr 2014 insgesamt 9.480 Neuerkrankungen bei Männern und 5.480 bei Frauen registriert (siehe Abbildung 1). Dabei stiegen die Neuerkrankungszahlen bei den männlichen Patienten seit 1999 kontinuierlich an.

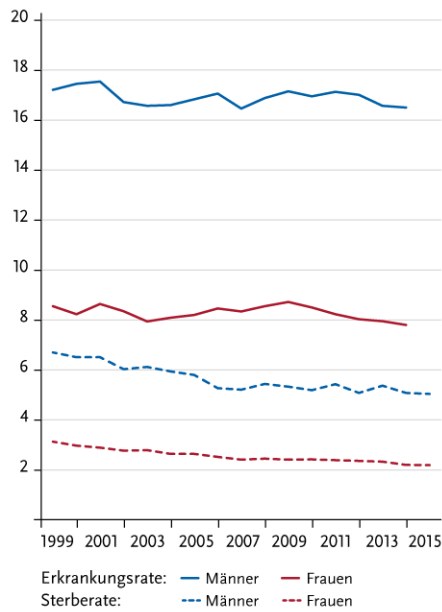


Abbildung 1: Absolute Zahlen der Neuerkrankungs- und Sterbefälle in Deutschland nach Geschlecht in den Jahren 1999-2014/2015 (Quelle: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft and der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) 2017)

Beim NZK handelt es sich um eine Erkrankung, die vor allem im höheren Lebensalter auftritt (siehe Abbildung 2). Dabei liegt der Häufigkeitsgipfel bei Männern und Frauen zwischen 75 und 84 Jahren. Die Erkrankung tritt bei Männern demnach doppelt so häufig auf wie bei Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ca. 70 Jahren. Grund für die steigenden Inzidenz ist die erhöhte Anzahl von Zufallsbefunden bei den bildgebenden Untersuchungsverfahren (Wang et al. 2015).

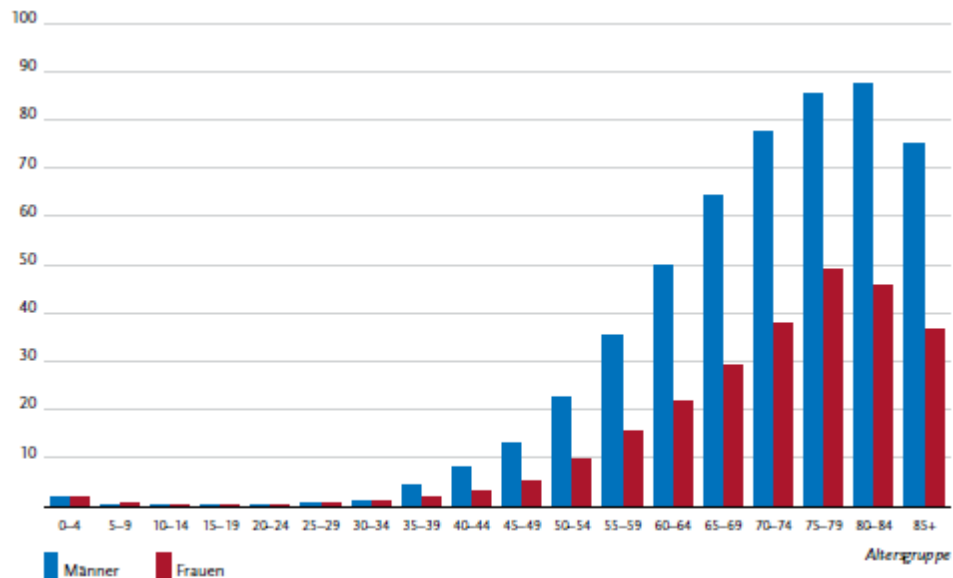


Abbildung 2: Altersspezifische Erkrankungsrate nach Geschlecht aus den Jahren 2013 und 2014 auf 100.000 Einwohner in Deutschland (Quelle: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) 2017)

2.1.1.2 Mortalität

Es wird ein rückläufiger Trend bei den Sterberaten beider Geschlechter in Europa, den USA und Australien beobachtet (Znaor et al. 2015). Im Jahr 2014 sind in Deutschland insgesamt 3243 Sterbefälle bei Männern und 2035 bei Frauen festgestellt worden (siehe Abbildung 1). Demnach liegt die Mortalitätsrate bei Männern etwa 1,6 mal so hoch wie bei Frauen. Das NZK stellt den urologischen Tumor mit der höchsten Mortalitätsrate dar (Cairns 2011). Dies liegt vor allem an dem hohen Metastasierungspotential (siehe Kapitel 2.1.9.).

2.1.2 Ätiologie

Die genaue Ursache für das Auftreten eines NZK ist noch nicht geklärt. Es werden individuelle Lebensgewohnheiten, Mutationen und Umwelteinflüsse diskutiert, die in einen direkten Zusammenhang mit der Entstehung eines NZK gebracht werden.

Generell wird zwischen modifizierbaren und nicht modifizierbaren Risikofaktoren unterschieden. Zu den modifizierbaren Risikofaktoren des NZK gehören unter anderem psychosoziale Faktoren wie der Nikotinabusus, ein erhöhter BMI sowie Hypertonie (Colt et al. 2011). Im Vergleich zu Nichtrauchern ist das Risiko an einem NZK zu erkranken bei männlichen Rauchern um etwa 50% und bei weiblichen um etwa 20% erhöht (Chow, Dong, and Devesa 2010). Außerdem steht eine Erhöhung des BMI in einem direkten Zusammenhang zum Auf-

treten eines NZK (Renehan et al. 2008). Ein weiterer Risikofaktor ist die arterielle Hypertonie. Ein erhöhter Blutdruck verdoppelt das Risiko, an einem NZK zu erkranken (Colt et al. 2011).

Zu den nicht modifizierbaren Risikofaktoren zählen erworbene Nierenzysten, eine terminale Niereninsuffizienz, genetische Faktoren und verschiedene Umwelteinflüsse (Port et al. 1989). Zu den genetischen Risikofaktoren werden unter anderem das von Hippel-Lindau-Syndrom (VHL-Syndrom), das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom, die hereditäre Leiomyomatose, das hereditäre papilläre NZK (HPRCC) und die tuberöse Sklerose gezählt (Haas and Nathanson 2014). Des Weiteren wird auch der Kontakt mit Toxinen wie Cadmium und Blei als auslösender Faktor diskutiert (Pesch et al. 2000).

2.1.3 Klassifikation der Nierenzellkarzinome

Nach der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation* – WHO) von 2016 werden verschiedene Subtypen des NZK unterschieden. Zu den häufigsten Subtypen gehören das klarzellige, das papilläre, das chromophobe, das zystisch-solidale und das unklassifizierbare Karzinom. Jeder Subtyp weist dabei ein unterschiedliches zytogenetisches und immunhistochemisches Profil sowie eine unterschiedliche Prognose auf (Ng et al. 2008). Die Einteilung der verschiedenen Subtypen nach der neuen WHO-Klassifikation von 2016 wird in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der verschiedenen Subtypen des NZK nach aktueller S3-Leitlinie von 2016 (Quelle: Moch 2016a)

Epitheliale Nierenzelltumoren	Klarzelliges Nierenzellkarzinom Multilokuläre zystische Neoplasie mit niedrigem Malignitätspotenzial Papilläres Nierenzellkarzinom Hereditäre-Leiomyomatose- und Nierenzellkarzinom-assoziiertes Nierenzellkarzinom Chromophobes Nierenzellkarzinom Sammelrohrkarzinom Medulläres Karzinom der Niere MiT-Familie der Translokationskarzinome Succinat-Dehydrogenase-defizientes Nierenzellkarzinom Muzinöses tubuläres und spindelzelliges Karzinom Erworbene Zystennieren-assoziiertes Nierenzellkarzinom Klarzelliges papilläres Nierenzellkarzinom Nierenkarzinom, nicht klassifiziert Papilläres Adenom Onkozytom
Metanephrische Tumoren	Metanephrisches Adenom Metanephrisches Adenofibrom Metanephrischer Stromatumor
Nephroblastische und zystische Tumoren im Kindesalter	Nephrogene Reste Nephroblastom Zystisches partiell differenziertes Nephroblastom Pädiatrisches zystisches Nephrom
Mesenchymale Tumoren	<i>Hauptsächlich im Kindesalter:</i> Klarzellsarkom Rhabdoidtumor Kongenitales mesoblastisches Nephrom Ossifizierender Nierentumor des Kindesalters <i>Hauptsächlich bei Erwachsenen:</i> Leiomyosarkom Angiosarkom Rhabdomyosarkom Osteosarkom Synoviales Sarkom Ewing-Sarkom Angiomyolipom Epitheloides Angiomyolipom Leiomyom Hämangiom Lymphangiom Hämangioblastom Juxtaglomerulärer Tumor Renomedullärer interstitieller Tumor Solitärer fibröser Tumor
Gemischte Epithel- und Stromatumorfamilie	Adultes zystisches Nephrom Gemischter Epithel- und Stromatumor
Neuroendokrine Tumoren	Hoch differenzierter neuroendokriner Tumor Großzelliges neuroendokrines Karzinom Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom Paragangliom
Verschiedene Tumoren	Hämatopoetische Tumoren der Niere Keimzelltumoren
Metastasen	

Das kNZK repräsentiert mit 70-80% den am häufigsten diagnostizierten Subtyp (Xing and He 2016) und weist im Vergleich zu den anderen Subtypen eine schlechtere Prognose auf (siehe Kapitel 2.1.9). Aufgrund dessen steht das kNZK im Fokus dieser Arbeit.

2.1.4 Pathologische Makroskopie und Mikroskopie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Das kNZK ist ein Tumor, welcher aus dem Epithel des proximalen Tubulus hervorgeht (Sarto et al. 1997). Es ist durch Tumorzellen mit einem klaren und eosinophilen Zytoplasma definiert. Typischerweise zeigt sich ein solides Wachstumsmuster mit einer deutlichen Vaskularisation (Amann et al. 2016).

Makroskopisch zeigen sich die klassischen kNZK in der Regel mit einer gelb-braunen Schnittfläche und mehreren hämorrhagischen Bereichen (siehe Abbildung 3). Der Tumor ist dabei relativ deutlich von dem gesunden Nierengewebe abgetrennt. Gelegentlich zeigen sich Narbenbereiche, von denen einige eine Verkalkung aufweisen können (Muglia and Prando 2015). Nekrosen und Flüssigkeitsansammlungen können dem Tumor ein zystisches Aussehen verleihen. In 4-10% der Fälle kann es zu einer Invasion der Vena cava inferior kommen. Dabei entsteht ein Tumorzapfen, der bis in den rechten Vorhof reichen kann (Zugor et al. 2008).

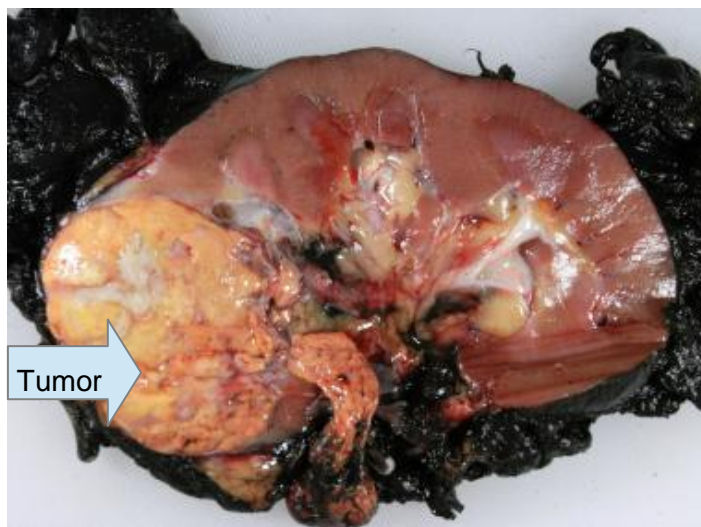


Abbildung 3: Makroskopie des kNZK. Die Lipidansammlungen verleihen dem Tumor ein typisches gelbliches Aussehen (Quelle: *Pathology of Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Definition, Epidemiology, Etiology* 2016).

Mikroskopisch wird das kNZK durch große einheitliche Zellen mit reichlich klarem Zytoplasma charakterisiert (siehe Abbildung 4). Das Zytoplasma ist reich an Glykogen und Lipid, wodurch die Zellen in Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbungen) ein typisches Aussehen erhalten. Die Zellen mit einem höheren mitochondrialen Inhalt können auch ein eosino-

philes oder körniges Aussehen haben (Sarto et al. 1997). Die Kerne sind abgerundet und ihre Eigenschaften hängen von dem Differenzierungsgrad ab (Algaba et al. 2011). Die Einteilung der Differenzierungsgrade der pathologischen Tumor-Nodus-Metastasen-Kategorie (pTNM-Kategorie) wird in Kapitel 2.1.7 näher erläutert.

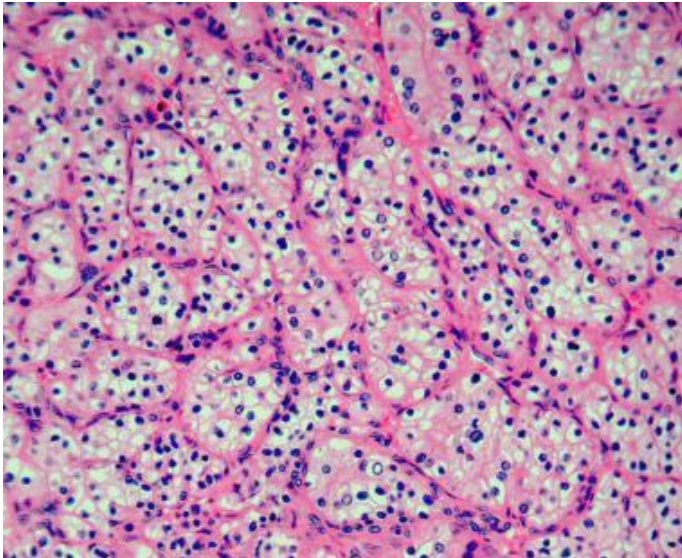


Abbildung 4: Mikroskopisches Bild eines kNZK nach HE-Färbung. Zahlreiche Epithelzellen mit einem klaren Zytoplasma und einer ausgeprägten Zellmembran werden von einem zarten Gefäßnetz durchzogen (Quelle: *Pathology of Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Definition, Epidemiology, Etiology* 2016).

Immunhistochemisch exprimieren die Zellen niedermolekulare Zytokeratine und Vimentin. Zytokeratine werden von epithelialen Zellen gebildet und repräsentieren als Intermediärfilamente den wichtigsten Teil des Zytoskeletts. In nahezu 100% der Fälle werden *Cluster of Differentiation*-10-Antigene (CD10 Antigene) exprimiert (Amann et al. 2016).

2.1.5 Genetik des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

In über 96% der Fälle treten kNZK sporadisch auf. Den familiär gehäuften Tumoren, die ca. 4% ausmachen, liegen genetische Syndrome wie das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom und das VHL-Syndrom zugrunde (Azeem et al. 2011; Cairns 2011).

Die häufigsten hereditären Formen des NZK beruhen auf einer Keimzellmutation in dem VHL-Tumorsuppressor-Gen (VHL-Gen) auf Chromosom 3p. Dieses VHL-Gen kodiert für das VHL-Protein, welches den Abbau des Hypoxie-induzierenden Faktors (HIF) reguliert. Der Anstieg von HIF wiederum führt zu einer erhöhten Produktion von Wachstumsfaktoren (Masoud and Li 2015). Bei Patienten, welche an einem VHL-Syndrom leiden, liegt das durchschnittliche Erkrankungsalter bei ca. 37 Jahren. Diese Patienten leiden vermehrt an Nie-

renzysten und bilateralen kNZK (Cairns 2011). Klinisch zeigen die meisten Patienten eine Kombination von Hämangioblastomen, NZK und Phäochromozytomen (Schulz 2011).

Das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom ist auf genetische Veränderung im Folliculin-Gen (FLCN-Gen) zurückzuführen. Etwa 25-30% der Patienten entwickeln verschiedene Arten von Nierentumoren, dabei zeigen sich bei etwa 9% der Patienten kNZK (Azeem et al. 2011).

2.1.6 Diagnostik

Die Herausforderung bei der Diagnostik von Raumforderungen der Niere besteht darin, insbesondere gutartige Veränderungen wie Zysten oder Abszesse auszuschließen. Im weiteren Verlauf dient die weitere Diagnostik dazu, zwischen einer gutartigen und bösartigen Läsion zu unterscheiden, sowie das Ausmaß der Erkrankung festzustellen und dementsprechend eine optimale Behandlung zu gewährleisten. Hierfür müssen sowohl die klinischen Symptome richtig erkannt als auch die bildgebenden Untersuchungen genau interpretiert werden.

2.1.6.1 Klinische Symptome und Komplikationen

Allgemeine klinische Symptome treten im Frühstadium meist nicht auf. Lediglich 10% der Patienten weisen die typische Symptomtrias aus schmerzloser Makrohämaturie, kolikartigen Flankenschmerzen und tastbarem Tumorbefund auf (Cairns 2011). Diese Symptome entwickeln sich aber meist erst durch den Einbruch des Tumors in das Sammelrohrsystem. Problematisch ist zudem der mögliche Einbruch des Tumors in die *Vena renalis*. Linksseitig führt dies zu einem Abflusshindernis des venösen Blutes und somit zu einer Varikozele. Auch der Tumoreinbruch in die *Vena cava inferior* wird beschrieben. Hierbei besteht die Gefahr einer Cavathrombose mit nachfolgendem Embolierisiko (Ng et al. 2008). In 10-40% der Fälle entwickeln die Patienten mit einem kNZK paraneoplastische Syndrome. Diese können sowohl endokrin als auch nichtendokrin verursacht werden. Endokrine Syndrome werden durch die vermehrte Hormonproduktion des Tumors verursacht. Zu diesen paraneoplastischen Syndromen zählen z.B. die Hyperkalziämie, die arterielle Hypertonie, die Polyzythämie und das Cushing-Syndrom (Palapattu, Kristo und Rajfer 2002).

2.1.6.2 Bildgebende Untersuchungen

Zur Diagnostik eines NZK dient insbesondere die Bildgebung. Zeigt sich im Ultraschall eine zentrale oder peripher wachsende echoarme bis echogleiche Raumforderung der Niere, ist eine abdominelle Computertomographie (CT) bzw. eine Magnetresonanztomographie (MRT) indiziert (Hertzberg and Middleton 2015). Zum Ausschluss bzw. Nachweis einer bereits stattgefundenen Metastasierung sollte im weiteren Verlauf ein ausführliches Staging mittels einer

Sonographie des Abdomen, eines Röntgen-Thorax, einer Sklettszintigraphie und einer zerebralen CT erfolgen (Herold 2016).

2.1.7 Stadieneinteilung und Malignitätsgrad

Die Einteilung der NZK erfolgt anhand der TNM-Klassifikation. Diese Klassifikation entstand aus statistischen Daten, welche eine Aussage über die Prognose von Tumorerkrankungen zulassen. Darauf aufbauend wird über die weitere Therapie entschieden (Wittekind 2017). In Tabelle 2 ist die TNM-Klassifikation aufgeführt.

Tabelle 2: pTNM-Kategorien und histopathologisches Grading des NZK (Quelle: Amann et al. 2016)

TNM-Klassifikation	
T-Primärtumor	
<u>T0</u>	Kein Anhalt für Primärtumor
<u>T1</u>	Tumor 7cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T1a	Tumor 4cm oder weniger in größter Ausdehnung
T1b	Tumor mehr als 4cm, aber nicht mehr als 7cm in größter Ausdehnung
<u>T2</u>	Tumor mehr als 7cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T2a	Tumor mehr als 7cm, aber nicht mehr als 10cm in größter Ausdehnung
T2b	Tumor mehr als 10cm in größter Ausdehnung
<u>T3</u>	Tumor breitet sich in größter Vene aus oder infiltriert direkt perirenales Gewebe, jedoch nicht in ipsilaterale Nebenniere und nicht über die Gerota-Faszie hinaus
T3a	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in die Nierenvene oder ihre segmentalen Äste (mit muskulärer Wand) oder Infiltration des perirenal und/oder peripelvinen Fettgewebes, aber nicht über die Gerota-Faszie hinaus
T3b	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in die V. cava unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in die V. cava oberhalb des Zwerchfells oder mit Infiltration der Wand der V. cava
<u>T4</u>	Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus (eingeschlossen die kontinuierliche Ausbreitung in die ipsilaterale Nebenniere)
N-Regionäre Lymphknoten	
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in einem regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten

M-	
Fernmetastasen	<i>Keine Fernmetastasen</i>
M0	<i>Fernmetastasen</i>
M1	

Im Stadium T1 werden bei beiden Geschlechtern etwa 66-68% der Nierentumoren diagnostiziert (siehe Abbildung 5). Tumoren im T4-Stadium machen nur einen geringen Anteil von 2% bei Erstdiagnose aus (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2017)

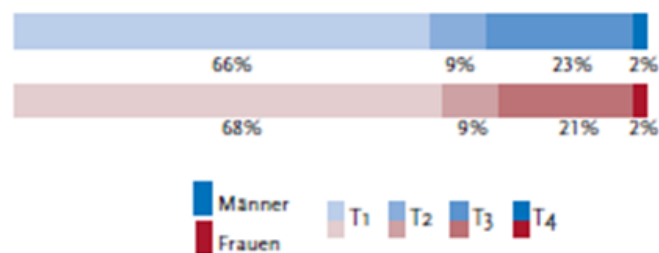


Abbildung 5: Auszug aus der Verteilung der T-Stadien bei Erstdiagnose nach Geschlecht. blaue Markierung = Männer; rot = Frauen (Quelle: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) 2017)

Die Stadieneinteilung des NZK kann neben der TNM-Klassifikation auch anhand der *Union for International Cancer Control* (UICC) erfolgen (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: UICC Stadieneinteilung des NZK (Quelle: UICC, 7. Edition, 2010)

UICC-Stadium	TNM-Stadium
Stadium I	T1
Stadium II	T2
Stadium III	T3 oder T1-T3, N1
Stadium IV	T4 oder N2 oder M1

Zur Abschätzung der Prognose wird zusätzlich eine Einteilung nach dem Graduierungssystem der *International Society of Urothology* (ISUP) vorgenommen. Dabei werden die einzelnen Nukleolen der Zellen beurteilt (siehe Tabelle 4). Hierbei werden die Zellen in Stufen G1-G4 unterteilt (Moch 2016a).

Tabelle 4: Graduierungssystem der ISUP für NZK von 2012 (Quelle: Moch 2016b).

Einteilung	
Grad 1	Nukleolen bei 400-facher Vergrößerung nicht/kaum sichtbar und basophil
Grad 2	Nukleolen bei 400-facher Vergrößerung eindeutig sichtbar und eosinophil
Grad 3	Nukleolen bei 100-facher Vergrößerung eindeutig erkennbar
Grad 4	Tumoren zeigen ausgeprägte Zellpolymorphien oder eine rhabdoide und/oder sarkomatoide Differenzierung

2.1.8 Therapie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Bei der Therapie eines kNZK muss zwischen einem lokal begrenzten und einem metastasierten Befund unterschieden werden. Die Therapie wurde dementsprechend in den letzten Jahren durch neue therapeutische Möglichkeiten zunehmend komplexer.

2.1.8.1 Therapie des nichtmetastasierten klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Zur kurativen Therapie des lokal begrenzten nichtmetastasierten NZK sollte eine vollständige chirurgische Resektion des Primärtumors erfolgen. Bei einem organbegrenzten NZK wird eine Nierenteilresektion leitliniengerecht empfohlen. Dies ergab ein verbessertes Gesamtüberleben (Ljungberg et al. 2015). Die Tumorsektion erfolgt dabei offen oder minimalinvasiv. Unter minimalinvasivem Vorgehen wird ein laparoskopisch oder robotischer Zugangsweg verstanden (Lane and Gill 2010).

2.1.8.2 Therapie des metastasierten klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Die Therapie des metastasierten kNZK ist ein palliativer Ansatz. Dies liegt daran, dass eine Chemo-, Strahlen oder Immuntherapie keine gute Wirkung auf kNZK zeigen (Nathan and Eisen 2002). Für die geringe Wirksamkeit der Chemotherapeutika wird die Expression des *Multidrug-Resistance-Proteins-1* (MDR-1 Protein) verantwortlich gemacht (Hodorová et al. 2008). Dieses Protein ist ein P-Glykoprotein, welches hydrophobe Substanzen wie die Chemotherapeutika aus der Zelle schleust (Nooter and Stoter 1996). Die operative Therapie des metastasierten NZK besteht wenn möglich aus einer Nierenteilresektion und ggf. einer Metastasenresektion mit nachfolgender Systemtherapie.

Für die systemische Therapie stehen seit einigen Jahren neue molekulare zielgerichtete Substanzen zur Verfügung. Diese Substanzen verhindern direkt die Proliferation und die Angiogenese der Tumoren, indem sie verschiedene Signalkaskaden beeinflussen. Im besonderen Fokus steht dabei der VHL-HIF α -Signalweg. HIF induziert, wie bereits in Kapitel 2.1.5. beschrieben, die Proliferation von verschiedenen Wachstumsfaktoren. Dazu zählen

vor allem der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), der *platelet-derived-growth-factor* (PDGF) und der *tumour growth factor- α* (TGF- α). Für die zielgerichtete Therapie des metastasierten kNZK ist es notwendig, diesen Signalweg effektiv zu inhibieren.

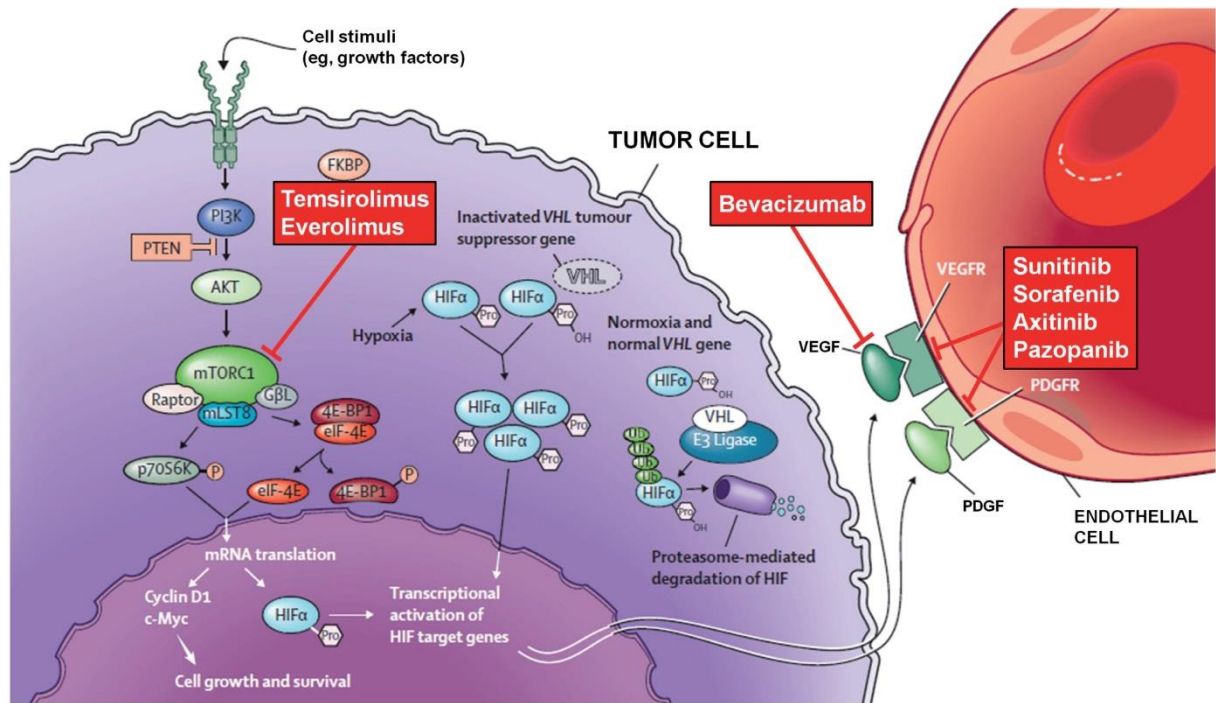


Abbildung 6: Angriffsziele der unterschiedlichen Therapeutika beim metastasierten NZK (Quelle: Rini and Atkins 2009).

Für diese zielgerichtete Therapie stehen momentan VEGF-Rezeptor-Antikörper, Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) und *mammalian target of Rapamycin*-Inhibitoren (m-TOR Inhibitoren) zur Verfügung. Die unterschiedlichen angezielten Moleküle sind in Abbildung 6 näher dargestellt und werden im Folgenden erläutert. Eine Übersicht über die unterschiedlichen Substanzen und deren Einsatz als Erst- oder Zweitlinientherapeutika gibt Tabelle 5.

Das kNZK verfügt meist über eine reiche Neovaskularisierung, welche durch die Überexpression von VEGF ausgelöst wird. VEGF ist ein Wachstumsfaktor, welcher durch Bindung an seinen Rezeptor auf den Endothelzellen die Angiogenese induziert. In diesem Zusammenhang werden monoklonale Antikörper gegen den VEGF-Rezeptor eingesetzt. Ein Vertreter der Angiogenese-Inhibitoren ist Bevacizumab (Avastin®) in Kombination mit INF- α .

Des Weiteren wurden verschiedene TKI entwickelt. Tyrosinkinasen sind membranständige Rezeptoren auf der Zelloberfläche, welche eine Phosphorylierung von Tyrosin-Resten von Proteinen ermöglichen. Diese Phosphorylierung aktiviert eine Signalkaskade, welche die Zellteilung initiiert und steuert. Die Inhibitoren dieser Rezeptor-Tyrosinkinasen sind Multi-kinase-Inhibitoren, da sie in der Lage sind mehrere Rezeptorkinasen gleichzeitig zu hem-

men. Zu diesen Rezeptoren gehören der VEGF-Rezeptor, der Plättchen-Wachstumsfaktor (*platelet-derived-growth-factor* - PDGFR), der Stammzellfaktorrezeptor (c-KIT), die *FMS-like tyrosin kinase 3* (FLT-3), der koloniestimulierende Faktor (*colony-stimulating-factor* - CSF-1 F) und der *Glial Cell Derived Neurotrophic* Faktor (RET) (Li et al. 2016). Diese Rezeptoren befinden sich vor allem auf Endothelzellen und inhibieren somit die Angiogenese (Jeltsch et al. 2013). Die zurzeit eingesetzten Substanzen sind Sunitinib (Sutent®), Pazopanib (Votrient®), Sorafenib (Nexavar®) und Axitinib (Inlyta®). Dabei werden Sunitinib und Pazopanib zur Erstlinientherapie bei einem niedrigen oder intermediären Risiko eingesetzt (siehe Tabelle 5). Sorafenib kommt in der Zweitlinientherapie nach vorheriger Zytokintherapie zum Einsatz. Ebenso wird Axitinib nur in der Zweitlinientherapie nach Zytokin- oder Sunitinibtherapieversagen verwendet.

Ein weiterer systemischer Ansatz zur Therapie sind die m-Tor Inhibitoren Temsilotimus (Tosirisel®) und Everolimus (Afinitor®). M-Tor ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche eine zentrale Rolle im Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Signalweg spielt. Dabei reguliert sie die Zellproliferation, das Überleben, die Mobilität und die Angiogenese (Fasolo and Sessa 2008). Als Therapie der Wahl in der Erstlinie für Patienten mit hohem Progressionsrisiko sollte laut aktueller Leitlinie von 2017 Temsilotimus eingesetzt werden. Als Zweitlinientherapie nach vorheriger VEGF-Rezeptor Therapie wird Everolimus in Kombination mit Lenvatinib verabreicht. Lenvatinib ist ein kleinmolekularer TKI von VEGF und Rezeptoren von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (Tannir et al. 2018).

Tabelle 5: Erst- und Zweitlinientherapie des metastasierten NZK. (Quelle: Leitlinienprogramm Onkologie - S3 Leitlinie Nierenzellkarzinom 2017).

Behandlung	Risiko oder Vorbehandlung	Empfohlene Therapie
Erstlinientherapie	niedrig/intermediär	Bevacizumab + INF- α Sunitinib Pazopanib
	ungünstig	Temsirolimus
Zweitlinientherapie	vorherige VEGF-Rezeptor-Therapie	Nivolumab Cabozantinib Lenvatinib + Everolimus
	vorherige Sunitinib	Axitinib
	vorherige Zytokin-Therapie	Axitinib Sorafenib Pazopanib
	vorherige mTor-Therapie	Tyrosinkinaseinhibitoren

Als neue vielversprechende Wirkstoffe stehen seit kurzem der Checkpoint-Inhibitor Nivolumab (Opdivo®) und der Multikinase-Inhibitor Cabozantinib (Cabometyx®) zur Verfügung. Nivolumab ist ein monoklonaler Antikörper, welcher die Liganden *programmed death* – L1 (PD-L1) und *programmed death*–L2 (PD-L2) blockiert. Diese Liganden werden normalerweise von Tumorzellen genutzt, um bei T-Zellen einen programmierten Zelltod zu induzieren (Motzer et al. 2015). Cabozantinib ist ein TKI, welcher sowohl an den VEGF-Rezeptor als auch an mehrere Tyrosinkinasen gleichzeitig binden und diese blockieren kann (Wiecek and Karcher 2016).

Die Indikation zur individuellen Therapiewahl wird anhand der Prognose gestellt. Zur Prognoseeinteilung werden die Memorial Sloan Kettering Cancer Center-Kriterien (MSKCC-Kriterien) herangezogen (siehe Tabelle 6). Diese wurden zur Prognosebewertung beim metastasierten NZK entwickelt. In nachfolgender Tabelle sind die 5 Kriterien aufgelistet. Insgesamt kann pro Kategorie ein Punkt vergeben werden. Bei 3-5 Punkten besteht ein hohes Risiko, bei 1-2 Punkten ein mittleres Risiko und bei 0 Punkten werden die Patienten in eine Niedrigrisikogruppe eingeteilt. Durch diese Einteilung in Risikogruppen wird die Therapieform entschieden. Die Prognosebewertung spielt demnach eine entscheidende Rolle zur zielgerichteten Therapie des metastasierten NZK (Bamias et al. 2010).

Tabelle 6: MSKCC-Kriterien zur Prognosebewertung beim metastasierten NZK (Quelle: Motzer et al. 2009).

MSKCC-Kriterien
<ul style="list-style-type: none"> - Karnofsky Index < 80% - LDH > 1,5 des oberen Normwertes - Hämoglobin unterhalb des unteren geschlechtsspezifischen Normwertes - Calcium > 2,5 mmol/l (>10 mg/dl) - Zeit von der Erstdiagnose bis zum Beginn der systemischen Behandlung < 1 Jahr

Eine weitere Risikoeinteilung der Patienten kann anhand der International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium-Kriterien (IMDC-Kriterien) erfolgen (siehe Tabelle 7). Bei 0 Risikofaktoren werden die Patienten der Niedrigrisikogruppe mit einer guten Prognose zugeordnet. Zur intermediären Gruppe werden alle Patienten mit 1-2 Risikofaktoren gezählt. Weisen die Patienten über 2 Risikofaktoren auf, zählen sie zur Risikogruppe mit einer schlechten Prognose (Quelle: Ko et al. 2015).

Tabelle 7: IMDC-Kriterien zur Prognosebewertung beim metastasierten kNZK (Quelle: Ko et al. 2015)

IMDC-Kriterien
<ul style="list-style-type: none"> - Zeit von der Diagnose bis zur Therapie < 1 Jahr - Karnofsky Index < 80% - Hämoglobin unterhalb des Normwertes - Calcium überhalb des Normwertes - Neutrophile überhalb des Normwertes - Thrombozyten überhalb des Normwertes

2.1.9 Metastasierung und Prognose

Die Prognose des kNZK ist abhängig vom Subtyp, dem Zeitpunkt der Diagnose, der Ausdehnung des Tumors sowie der Metastasierung.

Die Metastasierung des kNZK erfolgt vorwiegend hämatogen und seltener lymphogen. Die häufigsten Metastasierungsorte sind die Lungen mit 37%, gefolgt von den Knochen mit 22%, der Leber mit 19% und dem Gehirn mit 8% (Sivaramakrishna et al. 2005). In diesen Organen bilden sich zunächst Mikrometastasen. Als Mikrometastasen werden Zellverbände bezeich-

net, die eine Größe kleiner als 2 mm aufweisen (Quail and Joyce 2013). Um Metastasen bilden zu können, lösen sich Zellen aus dem Primärtumor und wandern in die Gefäße ein. Dieser Vorgang wird auch als Intravasation bezeichnet. Durch die hämatogene Ausbreitung gelangen die Tumorzellen in ferner gelegene Organe und können sich an das Gefäßendothel anheften. Danach erfolgt eine Extravasation durch die Blutgefäße. Aus den anfänglichen Mikrometastasen können im weiteren Krankheitsverlauf Makrometastasen entstehen (Bäumler 2008). Liegen bereits bei der Primärtumordiagnose Metastasen vor, wird von einer synchronen Metastasierung gesprochen. Im Gegensatz dazu wird von einer metachronen Metastasierung gesprochen, wenn die Metastasen erst zu einem späteren Zeitpunkt auftreten.

Zum Zeitpunkt der Diagnose liegt bereits bei ca. 20% aller Patienten eine synchrone Metastasierung vor. Etwa 20% der Patienten entwickeln im Verlauf der Erkrankung metachrone Metastasen oder Rezidive (Dabestani et al. 2016).

Die Überlebensraten beim kNZK liegen im Vergleich zu den anderen Subtypen am niedrigsten. Die beste Prognose zeigen die papillären NZK mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 91%, gefolgt von den chromophoben NZK mit 88%. Die schlechteste Prognose zeigen die kNZK mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 71% (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Tumorspezifisches Überleben von chirurgisch behandelten Patienten der verschiedenen Subtypen des NZK ccRCC = clear cell renal cell carcinoma, pRCC = papillary renal cell carcinoma, chRCC = chromophobe renal cell carcinoma (Quelle: Ljungberg et al. 2017)

Überlebenszeit (in %)	5 Jahre	10 Jahre	15 Jahre	20 Jahre
ccRCC	71	62	56	52
pRCC	91	86	85	83
chRCC	88	86	84	81

Des Weiteren ist die Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation für die Prognose ausschlaggebend. Mit der Einteilung in ein höheres Stadium sinken daher auch die 5-Jahres-Überlebensraten. Aus Tabelle 9 lässt sich entnehmen, dass die Überlebensrate von 97% in Stadium I auf eine 5-Jahres-Überlebensrate von 16,5% in Stadium IV sinkt. Stadium I ist dadurch definiert, dass es sich um ein lokal begrenztes NZK handelt, welches durch eine operative Therapie zu sehr guten kurativen Ergebnissen führt. Dazu ist zu sagen, dass die Überlebensrate auch immer vom Subtyp abhängig ist.

Tabelle 9: Relatives 5-Jahres-Überleben für Patienten mit NZK nach UICC (Tumorregister München 2018)

UICC Stadium	5-Jahres-Überlebensrate
I	97,5%
II	88,7%
III	71,9%
IV	16,5%

Das Stadium IV ist dadurch gekennzeichnet, dass bereits Metastasen diagnostiziert worden sind. Dabei beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei einem metastasierten NZK lediglich 16,5%. Die Metastasierungsrate spielt demnach eine entscheidende Rolle in der Prognose. Die hohe Metastasierungsrate ist auch die Ursache, dass das kNZK den urologischen Tumor mit der höchsten Mortalitätsrate darstellt (Cairns 2011).

Des Weiteren werden zur verbesserten Prognoseabschätzung verschiedene klinische, biologische und histologische Daten herangezogen. Dafür wurde eine Reihe von unterschiedlichen Modellen entwickelt. Zu diesen Modellen gehört für die lokalen NZK das *University of California Los Angeles integrated staging system* (UISS), das *Stage Size Grade Necrosis-System* (SSIGN) sowie das Karakiewicz-Normogramm. Für die metastasierten Tumoren haben sich das System des *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (MSKCC), das *International Metastatic Renal Cancer Database Consortium* (IMDC) und das Heng's Modell etabliert (Llungberg et al. 2017). Alle Modelle berücksichtigen verschiedene Variablen wie z.B. die TNM-Klassifikation, das ISUP Grading, die Tumorgöße und Laborwerte wie beispielsweise den Hämoglobinwert. Als Beispiel sind die Modelle für die metastasierten Tumoren in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Modelle zur Prognosebewertung beim metastasierten NZK mit unterschiedlichen eingesetzten Variablen (Quelle: Llungberg et al. 2017).

Modell	Variable							
	Karnofsky Index	Delay between diagnosis and treatment	Related symptoms	LDH	Corrected Calcium	Hb	Neutrophil count	Platelet count
MSKCC	X	X		X	X	X		
Heng's Modell	X	X			X	X	X	X
IMDC	X		X		X	X	X	X

Anhand dieser Kriterien werden die Patienten in unterschiedliche Kategorien eingeteilt, in denen Hochrisikopatienten von Niedrigrisikopatienten unterschieden werden. Die Prognose dieser beiden Modelle wird ausschließlich anhand von klinischen Faktoren bestimmt. Für das MSKCC und das Heng's Modell wurden unterschiedliche Validierungsstudien vorgenommen. Die Genauigkeit der MSKCC Kriterien lag jedoch nur bei 52-64% (Karakiewicz et al. 2011).

Durch das IMDC-Modell werden die Patienten ebenfalls in unterschiedliche Risikogruppen eingeteilt werden. Anhand dieser Klassifikation werden die Patienten einer unterschiedlichen Systemtherapie zugeordnet werden. Heng et al. validierten dieses Modell und ermittelten 2-Jahres-Überlebensraten (Heng et al. 2013). Die Ergebnisse zeigen in der Hochrisikogruppe lediglich ein Gesamtüberleben von 7%. Im Vergleich hierzu liegt das Gesamtüberleben für die niedrige Risikogruppe bei 75% (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: 2-Jahres-Gesamtüberleben bei Patienten mit zielgerichteter Systemtherapie anhand der IMCD-Klassifikation (Quelle: Heng et al. 2013)

IMDC-Klassifikation	2-Jahres-Gesamtüberleben
Niedrige Risikogruppe	75%
Mittlere Risikogruppe	53%
Hohe Risikogruppe	7%

Grundsätzlich hängt die Prognose des einzelnen Patienten im Wesentlichen von der rechtzeitigen Erkennung und damit Behandlung der Metastasierung ab. Hierfür könnten molekula-

re Marker der entscheidende Schlüssel sein. Zudem erfolgt die Nachsorge der Patienten mit aufwendigen und kostspieligen bildgebenden Untersuchungen. Dies bringt jedoch den Nachteil, dass sich Rezidive oder Fernmetastasen erst ab einer bestimmten Größe darstellen lassen, in der sie durch die bildgebenden Untersuchungen sichtbar sind. Zur Früherkennung eines Rezidivs oder einer metachronen Metastasierung sind daher molekulare Marker von großer Bedeutung. Es wurden bereits zahlreiche molekulare Marker wie Carboanhydrase IX (CAIX), VEGF, HIF, Ki67 (Proliferation), p53-Protein, PTEN (*Phosphatase und tensin homolog, Zellzyklus*), E-Cadherin, C-reaktives Protein (CRP), Osteopontin und CD44 (Zelladhäsion) als Vorhersageindikatoren identifiziert. Jedoch hat keiner dieser Marker die Vorhersagegenauigkeit der Prognose verbessert. Es besteht daher ein unmittelbarer Bedarf, neue molekulare Marker zu identifizieren, welche eine genaue histologische und biologische Klassifizierung von NZK, insbesondere dem kNZK ermöglichen und somit zur individuellen Prognosebewertung und Metastasierungsrisikoabschätzung herangezogen werden können (Rink et al. 2011).

2.2 MiRNAs

Als miRNAs bezeichnet man kurze nicht kodierende, endogene, einzelsträngige RNA-Moleküle mit einer Größe von 17-28 Nukleotiden, welche sowohl in menschlichen als auch in pflanzlichen Genomen vorhanden sind. Sie übernehmen vor allem die Aufgabe der posttranskriptionalen Regulation der Genexpression und damit der Proteinsynthese. MiRNAs steuern somit zelluläre Prozesse wie die Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Eine besondere Bedeutung kommt ihnen bei der Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen zu, da sie sowohl als Onkogene-, als auch als Tumorsuppressoren fungieren können (Yilin Wang et al. 2016). In den letzten Jahren konnten insgesamt über 1917 humane miRNAs identifiziert werden (miRBase.org, Stand Juli 2018).

2.2.1 Biogenese und Funktion

Die Transkription und Prozessierung der miRNAs erfolgt in mehreren Zwischenschritten wie in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Die Gene, welche für die miRNAs kodieren, sind evolutionär konserviert. Ihre Lokalisation befindet sich in 70% der Fälle innerhalb der Introns oder Exons von proteinkodierenden Genen und in 30% der Fälle außerhalb der Gene (A-cunzo et al. 2015).

Die Transkription der miRNAs erfolgt durch die RNA-Polymerase II. Dieser Prozess erzeugt ein langes Primärtranskript, welches als *primary microRNA* (pri-miRNA) bezeichnet wird und sich zu einer Schleife mit einem Stamm aus ca. 33 Basenpaaren zusammenlagert. Das *pri-miRNA*-Transkript ist mehrere Kilobasen lang und trägt eine Polyadenylierung (Poly-A-Schwanz) am 3'-Ende sowie ein *7-Methyguanosin-Cap* am 5'-Ende. Im Zellkern wird die *pri-miRNA* durch einen Mikroprozessor-Komplex gespalten. Dieser Komplex besteht u.a. aus einer RNase III (Drosha) und einem dsRNA-bindenden Protein (DGCR8). Durch die Abspaltung entsteht aus der *pri-miRNA* ein etwa 70 Kilobasen langes Transkript, welches als Präkursor-microRNA (pre-miRNA) bezeichnet wird und eine charakteristische Haarnadelstruktur (*hairpin*) aufweist (Ha and Kim 2014).

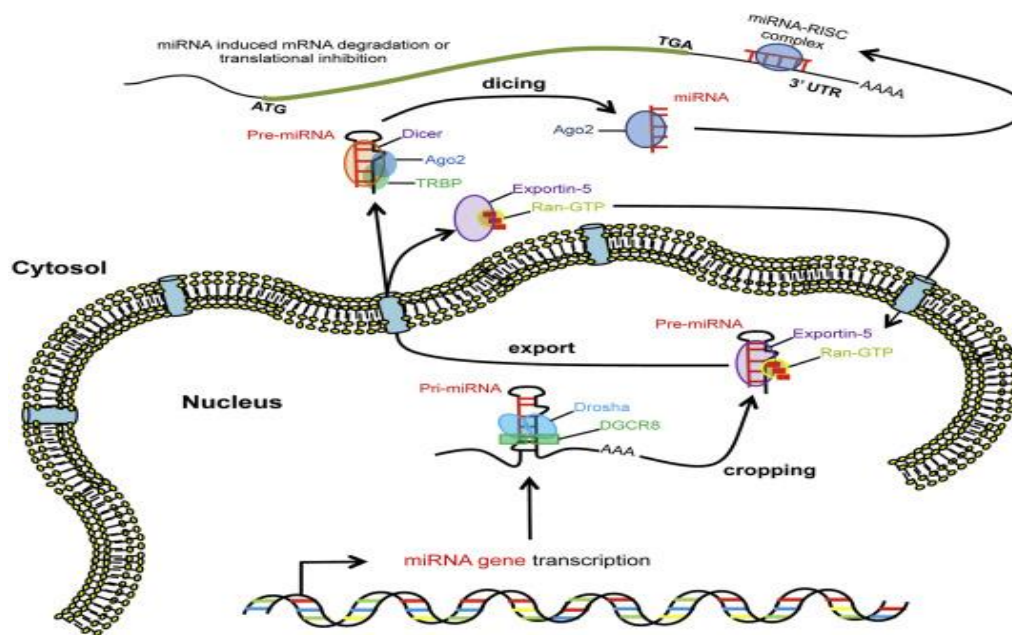


Abbildung 7: Schematische Darstellung der miRNA Biogenese (Quelle: Acunzo et al. 2015).

Die pre-miRNA besitzt einen Überhang aus zwei Nukleotiden am 3'-Ende. Dieser Überhang wird von Exportin-5 (XPO5) und seinem katalytischen Partner, dem Ran-GTP erkannt und gebunden. Dadurch wird der aktive Export über die Kernporen der Kernmembran aus dem Zellkern in das Zytosol ermöglicht (Lund et al. 2004). Im Zytosol wird die pre-miRNA durch eine RNase III, welche als Dicer Enzym bezeichnet wird, erkannt und zu einer reifen Duplex-miRNA gespalten. Bei diesem Schritt bindet sich der thermodynamisch stabilere miRNA-Strang an den *RNA-induced silencing complex* (RISC). Der RISC-Komplex setzt sich aus drei Kofaktoren zusammen: Dem *transactivation response RNA binding Protein* (TRBP), dem *protein kinase RNA activator* (PACT) und dem Argonautprotein-2 (Ago2) (Wink 2011). Das Argonautprotein setzt sich aus unterschiedlichen Domänen zusammen, welche in Abbildung 8 schematisch dargestellt sind. Die wichtigsten Domänen sind die Piwi Argonaut Zwiller Domäne (PAZ-Domäne), die mittlere-Domäne und die *P-element induced wimpy testis* Domäne (PIWI-Domäne). Die PIWI-Domäne besitzt eine RNase Funktion (Song et al. 2004). Das reife Strangfragment bleibt mit seinem 3'-Ende an der PAZ-Domäne des Argonautproteins gebunden, während der Gegenstrang entfernt und abgebaut wird. Dieser Schritt führt zu einer voll funktionsfähigen miRNA, welche sich mit Hilfe des AGO-Proteins und dem zugehörigen RISC-Komplex an eine Ziel-mRNA mit komplementärer 3'UTR Sequenz binden kann. Diese sogenannte *Seed-Region* besteht aus 2-8 Nukleotiden der miRNA, welche mit der Ziel-mRNA komplementäre und vollständige Bindungen eingehen muss. Die restlichen Nukleotide können dabei weniger stark gepaart sein (Djuranovic, Nahvi, and Green 2011).

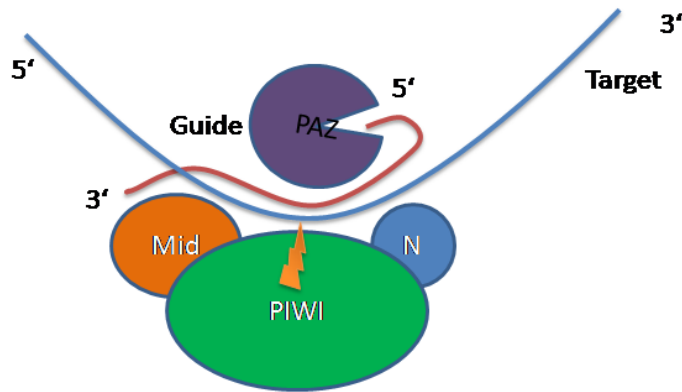


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Argonautproteins. PAZ = Piwi Argonaut Zwiller Domäne, Mid = mittlere-Domäne, PIWI = P-element induced wimpy testis Domäne, N = N-terminales Ende (Team:Freiburg Bioware/Project/AGO - 2009.igem.org n.d.).

Dabei bindet das 5'-Ende der reifen miRNA an den 3'-Bereich der Ziel-mRNA. Ist diese Bindung vollständig komplementär, wird die mRNA durch die RNase-Funktion der PIWI-Domäne des AGO-Proteins gespalten, degradiert und somit abgebaut. Eine unvollständige Komplementarität hat hingegen eine Repression der Translation zur Folge. Die Translation kann dabei durch unterschiedliche Mechanismen gesteuert werden, welche sowohl in der Initiationsphase, in der Elongation als auch in der Terminalphase stattfinden können.

Einerseits rekrutieren miRNAs mehrere Faktoren und Enzyme für die mRNA-Spaltung bzw. deren Abbau. Zu diesen Faktoren gehören Decapping-Enzyme, Deadenylasen, 3'- und 5'-Exonukleasen und Endonukleasen. Weiterhin konkurriert das AGO-Protein mit Cap-Binding-Proteinen (CBPs) um die Bindung an die Cap-Struktur der mRNA und hemmt somit die Translationsinitiation. Andererseits können miRNAs auch mit der Ribosomenuntereinheit interferieren. Sie können dadurch die Bindung der ribosomalen Untereinheit an die mRNA hemmen oder die Dissoziation fördern. Die Elongationsphase der Translation wird durch die miRNAs behindert, indem sie mit Elongationsfaktoren oder mit kotranslationalen Faktoren wie beispielsweise Exosomen konkurrieren.

Wurde die mRNA abgebaut oder die Translation blockiert, wird die miRNA mit gebundenem RISC-Komplex wieder freigesetzt und kann an eine weitere komplementäre Ziel-mRNA binden und diese regulieren. Es gibt für jede miRNA zahlreiche potentielle Ziel-mRNAs. Zusätzlich kann jede mRNA verschiedene Target-Sequenzen für unterschiedliche miRNAs besitzen. Dies kann die funktionelle Wirkung auf die Ziel-RNA potenzieren (Witkos, Koscińska, and Krzyzosiak 2011).

2.2.2 Regulation

2.2.2.1 Regulation der miRNA-Gene

Die kodierenden Bereiche für die miRNAs können in den sogenannten *Fragile Sites* lokalisiert sein (Calin et al. 2004). *Fragile Sites* im Genom sind in Tumoren häufig von Verlusten oder Zugewinnen betroffen (Dillon, Burrow, and Wang 2010). Diese Erkenntnis könnte eine Erklärung dafür sein, dass die miRNA-Expression in Tumoren verändert ist.

Des Weiteren spielt auch die Methylierung der DNA eine entscheidende Rolle in der Regulation der miRNAs. Die veränderte Methylierung von miRNA kodierenden Genen geht mit einer Deregulation der miRNA-Expression einher. Vor allem eine Hypermethylierung des Promotors scheint in spezifischen Tumoren eine Deregulation der miRNA zur Folge zu haben (F et al. 2016). Eine weitere Regulation kann durch Transkriptionsfaktoren erfolgen. Dies sind Proteine, die die Transkription aktivieren oder herunterregulieren können, indem sie an cis-regulatorische Elemente am 5'-Ende des kodierenden Gens binden (Hsieh et al. 2015).

2.2.2.2 Regulation der Transkription

Die Regulation der miRNAs kann auf unterschiedlichen Ebenen stattfinden. Ein Regulationsmechanismus auf posttranskriptioneller Ebene wird durch regulatorische Proteine verursacht (Slezak-Prochazka et al. 2010). Diese Proteine können in drei Gruppen unterteilt werden: Proteine, welche an die terminale Schleife der pri- und/oder pre-miRNAs binden und interagieren können, die Drosha-Bindungsproteine und die Dicer-Bindungsproteine. Drosha bildet eine Untereinheit eines größeren Komplexes, bestehend aus DEAD-box RNA Helikasen p68 und p72, sowie den Nuklearfaktoren (NF) 90 und NF45. Die Komplexe p68/p72 und NF90/NF45 können zu einem veränderten miRNA-Expressionsmuster führen (Sakamoto et al. 2009). Eine weitere Phase in der Biogenese, welche großen Einfluss auf die Regulation nimmt, ist die Entstehung der reifen miRNA durch das Dicer-Enzym. Dieses Enzym besteht aus den Kofaktoren TRBP und PACT. Liegen diese Kofaktoren in geringer Konzentration vor, so wird die Aktivität des Dicer-Enzyms herunterreguliert. Somit wird weniger reife miRNA prozessiert (Davis-Dusenbery and Hata 2010).

2.2.3 Bedeutung in der Tumorgenese

MiRNAs nehmen eine besondere Rolle in der Tumorgenese ein. Wie bereits erwähnt, regulieren miRNAs vielfältige zelluläre Prozesse wie die Differenzierung, die Proliferation und die Apoptose. Diese Eigenschaften spielen auch in der Tumorgenese eine wesentliche Rolle.

MiRNAs haben die Eigenschaft, sowohl als Onkogene als auch als Tumorsuppressoren agieren zu können. Onkogene miRNAs sind bei Tumorerkrankungen vermehrt exprimiert.

Sie fördern die Entstehung und Progression des Tumors, indem sie die Tumorsuppressorgene inhibieren. Gleichzeitig sind sie in der Lage, Gene, welche an der Kontrolle der Zelldifferenzierung, der Apoptose oder anderen Zellprozessen beteiligt sind, zu inaktivieren (Esque-la-Kerscher and Slack 2006).

Im Gegensatz dazu ist in Tumorzellen die Expression von miRNAs, die als Tumorsuppressoren fungieren, herunterreguliert (Lujambio and Lowe 2012). Diese können die mRNA für onkogene Proteine nicht mehr inhibieren und fördern somit die Tumorgenese (siehe Abbildung 9).

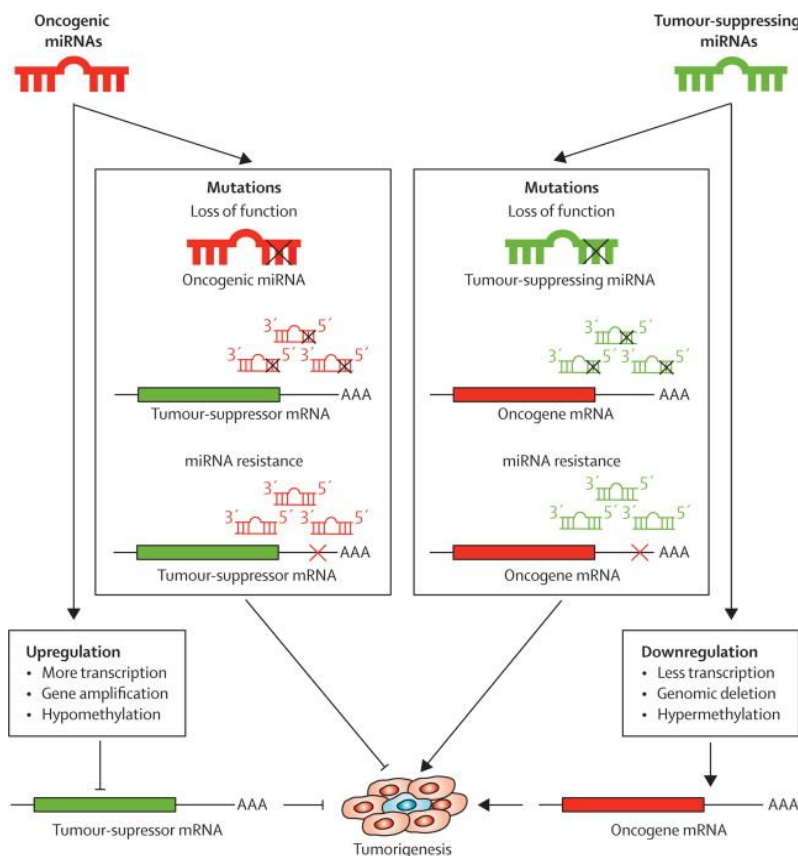


Abbildung 9: Regulation der Tumorgenese durch miRNAs (Quelle: Kong et al. 2012).

Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass die Expression von miRNAs bei verschiedenen pathologischen Prozessen wie z.B. bei Tumoren dereguliert ist. Diese Studien zeigten Unterschiede in der miRNA-Signatur zwischen Normal- und Tumorgewebe (Davis-Dusenbery and Hata 2010). Zudem weisen unterschiedliche Tumorentitäten verschiedene miRNA-Signaturen auf. Somit können anhand der miRNA-Expression unterschiedliche Tumorgewebe voneinander differenziert werden (Kohlhapp et al. 2015).

Einige miRNA-Familien wurden als sogenannte Onkomirs identifiziert. Als Onkomirs werden miRNAs bezeichnet, welche eine nachgewiesene Funktion in der Karzinomentstehung besitzen (Esque-la-Kerscher and Slack 2006). Eine wichtige Familie in diesem Zusammenhang ist

die miR-17-92-Familie. Die sechs Hauptvertreter sind die miRNAs miR-17, miR-18a, miR-19a, miR20a, miR-19b-1 und miR92a-1. Diese miRNAs nehmen Einfluss auf die Zellproliferation und Apoptose der Zellen (Mogilyansky and Rigoutsos 2013).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass spezifische miRNAs in einem Zusammenhang mit der Metastasierung stehen. Diese sogenannten Metastamirs wurden bereits für die meisten Tumorentitäten identifiziert (Hurst, Edmonds, and Welch 2009). In Abbildung 10 ist die unterschiedliche Funktion der Metastamirs dargestellt. Dabei wird zwischen miRNAs unterschieden, deren Expression die Metastasierung entweder fördern (*pro-metastatic*) oder inhibieren (*anti-metastatic*) können (Lopez-Camarillo et al. 2012).

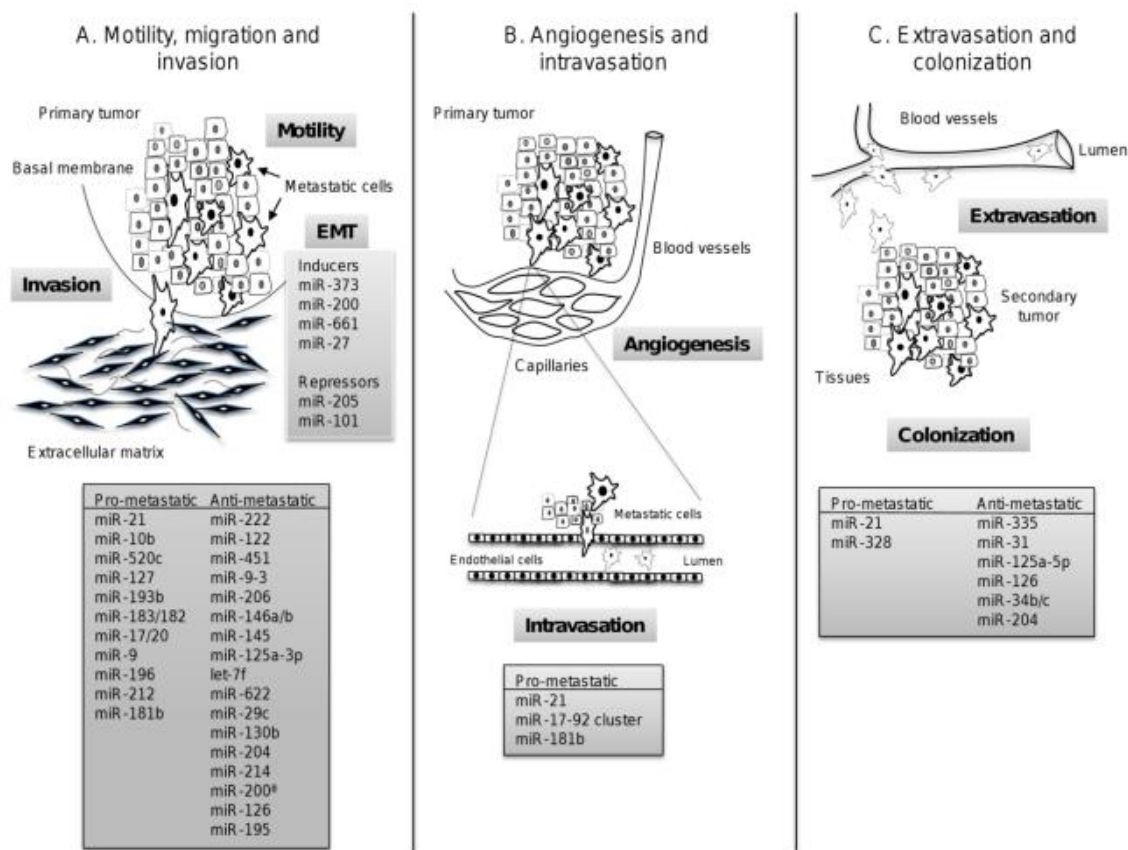


Abbildung 10: Auflistung der Metastamirs, welche die unterschiedlichen Metastasierungsprozesse fördern bzw. inhibieren (Quelle: Lopez-Camarillo et al. 2012).

2.2.4 Bedeutung der miRNAs im Nierenzellkarzinom

Für das NZK sind bereits zahlreiche Studien bezüglich der miRNA-Expression veröffentlicht worden. Dabei konnte bereits zwischen klarzelligen-, papillären-, chromophoben Karzinomen und Onkozytomen unterschieden werden (Youssef et al. 2011). Für das kNZK belegen weitere Daten, dass es deutliche Unterschiede zwischen der miRNA-Expression im nicht malignen Gewebe und Tumorgewebe gibt. In einer Studie von Juan et al. konnten 35 miRNAs

identifiziert werden, welche in ihrem Expressionsmuster eine Unterscheidung zwischen Normalgewebe und einem kNZK aufwiesen. Von diesen 35 miRNAs wurden 26 charakterisiert, welche im kNZK im Gegensatz zu Normalgewebe herunterreguliert wurden, wohingegen die restlichen 9 miRNAs eine Hochregulation aufwiesen. Die beiden miRNAs miR-155 und miR-21 waren, wie auch in anderen Tumorarten, beim kNZK im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert (Juan et al. 2010). Des Weiteren konnte bereits für einzelne miRNAs gezeigt werden, dass eine erniedrigte Expression mit einer schlechten Prognose einhergeht (Xiao et al. 2015:1). Deshalb könnte der Vergleich zwischen den miRNA-Expressionen von metastasierten und nichtmetastasierten Primärtumorgeweben dazu beitragen, die Primärtumoren mit einem hohen Risiko zu identifizieren und miRNAs als prognostische Marker zu nutzen (Fedorko et al. 2015).

In den Vorarbeiten der urologischen Forschungsgruppe an der Universität des Saarlandes wurden einige miRNAs als potentielle prognostische Marker identifiziert. In diesen Studien wurden Analysen an 33 Primärtumoren und 21 Fernmetastasen des kNZK an einem unabhängigen Patientenkollektiv durchgeführt. Es wurden dabei insgesamt 14 Kandidaten-miRNAs identifiziert, welche signifikante miRNA-Expressionsunterschiede zwischen metastasierten und nichtmetastasierten Primärtumoren des kNZK aufwiesen (Heinzelmann et al. 2014). Dabei zeigten die miRNAs miR-204, miR-30c und miR-30a und miR-30e-3p die höchste Herunterregulation in metastasierten Primärtumoren und Fernmetastasen im Vergleich zu nichtmetastasierten Primärtumoren. Darüber hinaus wiesen die miRNAs miR-139-5p und miR-144-5p eine deutliche Hochregulation in nichtmetastasierten Tumoren im Vergleich zu den metastasierten Tumoren auf (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: 14 Kandidaten-miRNAs aus FFPE-Gewebeproben von 33 Primärtumoren des kNZK. Es werden dabei die Expressionsunterschiede zwischen metastasierten bzw. nichtmetastasierten Primärtumoren verglichen (Quelle: Heinzelmann et al. 2014).

miRNAs	Chromosom	p-Wert	Fold Change
<i>Vermindert exprimiert in metastasierten Primärtumoren und Fernmetastasen</i>			
miR-204	9q21.12	6,9E-04	-12,06
miR-30c	1p34.2/6q13	6,3E-06	-3,40
miR-30a-3p	6q13	1,0E-03	-2,28
miR-30e-3p	1p34.2	1,8E-04	-2,19
miR-30c-2-3p	6q13	1,1E-03	-2,01
miR-30a-5p	6q13	2,4E-03	-1,86
miR-30e-5p	1p34.2	1,2E-02	-1,56
<i>Erhöht exprimiert in nicht metastasierten Primärtumoren</i>			
miR-139-5p	11q13.4	2,8E-05	4,49
miR-144-5p	17q11.2	1,4E-04	3,72
miR-451	17q11.2	1,8E-03	3,24
miR-126-5p	9q34.3	4,6E-04	2,68
miR-455-3p	9q32	4,8E-03	2,06
miR-126	9q34.3	3,9E-03	1,99
<i>Vermindert exprimiert in nicht metastasierten Primärtumoren</i>			
miR-1246	2q31.1	7,0E-03	-3,13

Um die Aussagekraft dieser Ergebnisse zu verifizieren, ist es notwendig, die bereits identifizierten miRNAs an einem unabhängigen Patientenkollektiv zu validieren. Auf dieser Grundlage soll eine spezifische miRNA-Signatur zur Vorhersage des Metastasierungsrisikos entwickelt werden.

Zudem wurden bereits in Vorversuchen der urologischen Forschungsgruppe mittels Proteomanalysen in einer 2D-Elektrophorese potentielle miRNA-Targets der miRNA miR-30a-3p in Zellkulturmodellen der Zelllinie 786-O identifiziert (siehe Abbildung 11). In dieser Arbeit sollten die bereits identifizierten Proteine als potentielle Targets ebenfalls für die miRNA miR-30e-3p identifiziert werden.

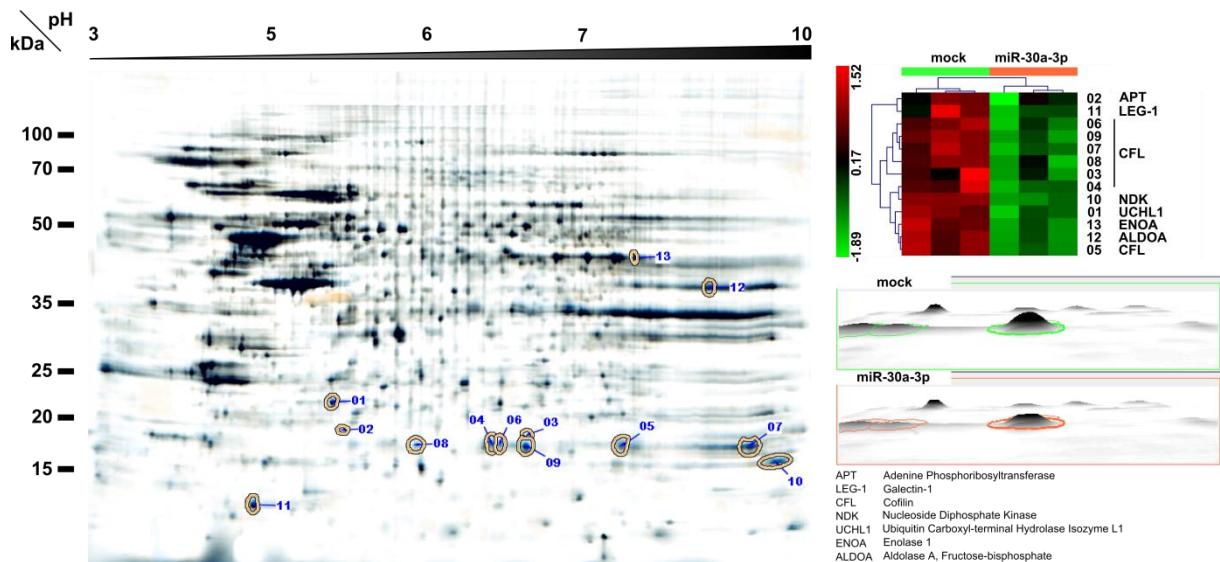


Abbildung 11: Proteomanalyse. Aus den Vorversuchen identifizierte miRNA-Zielgene mittels Proteomanalyse in der 2D-Elektrophorese. Beispielhaft aufgeführte Ergebnisse aus der Ermittlung von miRNA miR-30a-3p.

Die Auswertung der Proteomanalyse zeigte einzelne Proteine, welche eine unterschiedliche Expression zwischen der Probe ohne miRNA Transfektion (Mock) und mit transfizierter miRNA miR-30a-3p (Mimic) aufwiesen. Unter einer Transfektion mit der miRNA miR-30a-3p zeigte sich eine verminderte Proteinexpression einzelner Proteine. Zu diesen möglichen Zielproteinen der miRNA-30-Familie gehören unter anderem Cofilin und NDK, welche in dieser Arbeit für die miRNA miR-30e-3p validiert werden sollten.

3 Ziele der Arbeit

Das NZK stellt den urologischen Tumor mit der höchsten Mortalitätsrate dar. Entscheidend für die Prognose ist hierbei das Metastasierungspotential. Zur frühzeitigen Vorhersage des Metastasierungsrisikos bzw. zur Einteilung der Patienten in bestimmte Risikogruppen fehlen momentan geeignete molekulare Marker.

MiRNAs spielen hinsichtlich der Entstehung und Metastasierung von kNZK eine wesentliche Rolle. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden 14 miRNA-Kandidaten identifiziert, welche signifikante Expressionsunterschiede zwischen metastasierten und nichtmetastasierten Primärtumorgeweben des kNZK aufweisen und als mögliche prognostische Marker zur Einschätzung des Metastasierungsrisikos dienen können.

Um die prognostische Relevanz zu überprüfen, sollen die bereits charakterisierte miRNAs miR-30e-3p und miR-139-5p zur Bewertung des Metastasierungsrisikos validiert werden. Darüber hinaus sollen die spezifischen Targets der miRNA miR-30e-3p identifiziert werden.

Die Expressionsunterschiede zwischen metastasierten und nichtmetastasierten Primärtumoren des kNZK sollen in dieser Arbeit mittels qPCR an einem unabhängigen Patientenkollektiv für die beiden miRNAs miR-30e-3p und miR-139-5p retrospektiv evaluiert werden. Die prognostische Aussagekraft wird durch Korrelation der Expression zu den klinischen Verlaufsdaten (metastasierungsfreies Überleben, Gesamtüberleben) der Patienten mit biostatistischen Analysen überprüft.

Des Weiteren sollen die spezifischen miRNA-Targets der miRNA miR-30e-3p validiert werden. Hierfür wurden in Vorarbeiten potentielle miRNA-Zielgene in Zellkulturmodellen der Zelllinie 786-O auf Proteinebene für die miR-30a-3p identifiziert. Die Expression dieser Targets soll auf Proteinebene *in vitro* mittels Transfektionsstudien und Western Blot-Analysen für die miR-30e-3p überprüft werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zur Entwicklung von Signaturen spezifischer miRNAs als prognostische Marker zur Einschätzung des individuellen Metastasierungspotentials kNZK dienen, um individualisierte risikoadaptierte Therapiekonzepte zu ermöglichen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Biologische Materialien

Für die Analyse der metastasierungsassoziierten miRNA-Expression wurde das Gewebe von Patienten verwendet, die in den letzten 20 Jahren in der Klinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes und in der Klinik für Urologie der Universitätsklinik Jena an einem NZK operiert wurden. Die Gewebeproben wurden von einem Pathologen gemäß der WHO-Klassifikation zugeordnet, entsprechend der *Tumor-Nodus-Metastasis*-Klassifikation (TNM-Klassifikation) eingestuft und archiviert. Für diese Arbeit wurden die in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben (FFPE-Gewebeproben) von 100 Primärtumoren des klarzelligen NZK verwendet. 50 dieser Gewebeproben stammten von Patienten, die mindestens 5 Jahre metastasierungsfrei geblieben sind. Die weiteren 50 Gewebeproben stammten von Patienten mit Fernmetastasen. Die metastasierten Proben wurden so ausgewählt, dass sowohl Gewebeproben mit synchronen als auch mit metachronen Metastasen zur Verfügung standen. Des Weiteren wurden zur Kontrolle 10 normale Nierengewebe begutachtet, welche mindestens 3 cm entfernt vom Tumorareal entnommen wurden. Eine klinische und histopathologische Übersicht über die verwendeten Gewebeproben ist in Tabelle 13 gezeigt.

Tabelle 13: Klinische und histopathologische Übersicht der verwendeten Gewebeproben.

<u>Klinische Daten</u>		
<u>Patienten</u>	Gesamt	102
Alter (in Jahren)	Mittelwert/Median (Minimum/Maximum)	63/67 (39/82)
Geschlecht	männlich/weiblich	70/32
T-Kategorie	1	62
	2	9
	3	30
	4	1
Grading	1	8
	2	77
	3	15
	4	1
	unbekannt	1
Überleben	verstorben/lebend	23/79
Beobachtungszeitraum	Mittelwert/Median	67/74 Monate
(mind. 5 Jahre)	Minimum/Maximum	0/134 Monate
Metastasierungsstatus	nichtmetastasiert/metastasiert	48/54 (16/38)
	(synchron/metachron)	
Metastasierungszeitraum	Mittelwert/Median	54/61 Monate
	Minimum/Maximum	0/126 Monate
Normalgewebe (mind. 3 cm)	Gesamt	10

Für die Entwicklung von Zellkulturmodellen wurde die Zelllinie 786-O verwendet. Diese Zelllinie stammt aus einem metastasierten Primärtumor des klarzelligen NZK. Sie zeichnet sich durch hohe proliferative, invasive und migratorische Fähigkeiten aus. Die Verdopplungszeit für die Zelllinie 786-O liegt bei ca. 24 Stunden.

4.1.2 Geräte und Programme

Luna™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems; San Francisco; USA
NanoDrop™ Spektrophotometer ND-1000	NanoDrop Technologies; Wilmington; USA
REST 2008	M.W. Pfaffl; München; Deutschland
StepOnePlus™ System	Applied Biosystems; Foster City; USA
Typhoon 9410 Scanner	HealthCare GmbH; Freiburg; Deutschland
Software ImageJ 1.48v	

4.1.3 Chemikalien und Kitsysteme

4.1.3.1 Gesamt-RNA-Isolierung, RT-PCR und qPCR

Ethanol 96%	Sigma-Aldrich; St. Louis; USA
miRNeasy FFPE Kit	Qiagen; Hilden; Deutschland
miRNeasy Mini Isolationskit	Qiagen; Hilden; Deutschland
nukleasefreies Wasser	Qiagen; Hilden; Deutschland
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems; FosterCity; USA
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems; Foster City; USA
TaqMan® Micro-RNA Assay	Applied Biosystems; Foster City; USA
TaqMan® qPCR-Primer	Applied Biosystems; Foster City; USA
Xylol	Zentrales Chemikalienlager UdS

4.1.3.2 Zellkultur

Zellkultur 785-O	Nährmedium: <ul style="list-style-type: none">• 50% Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)• 50% Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)• 10% fetales Kälberserum (FKS)
DharmaFECT 2 Transfection Reagent	Dharmacon™ Gelifesciences

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich; St. Louis; USA
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich; St. Louis; USA
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich; St. Louis; USA
Opti-MEM®	Life Technologies; USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich; St. Louis; USA
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	Sigma-Aldrich; St. Louis; USA
Trypsin	Sigma-Aldrich; St. Louis; USA
Tryptanblau	Sigma-Aldrich; St. Louis; USA

4.1.4 Puffer und Lösungen zum Proteinnachweis

4.1.4.1 Zellernte

CHAPS Lysepuffer	Tris (pH = 7,5)	50 mM
	NaCl	150 mM
	MgCl ₂	1 mM
	CHAPS	2% (m/v)
Protease Inhibitor	100x	(SERVA)

4.1.4.2 SDS-PAGE

4x Trenngelpuffer	Tris (pH = 8,8)	1,5 M
4x Sammelgelpuffer	Tris (pH = 6,8)	0,5 M
10x Laufpuffer:	Tris	250 mM
	Glycin	1,92 mM
	SDS	0,1% (m/v)
6x Probenpuffer (reduzierend)	Glycerin	30% (v/v)
	SDS	1% (m/v)
	Dithiotriol (DTT)	600mM
	Bromphenolblau	1x Spatelspitze
	mit 4x Trenngelpuffer auf Endvolumen auffüllen	
6x Probenpuffer (Nicht reduzierend)	Glycerin	30% (v/v)
	SDS	1% (m/v)
	Bromphenolblau	1x Spatelspitze
	mit 4x Trenngelpuffer auf Endvolumen auffüllen	
Acrylamid/Bisacrylamid (A/B)	Acrylamide/Bis Solution, 37 5:1 SERVA	

10% APS	Amoniumpersulfat 10% (m/v)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine (SERVA)
Proteinstandard	SERVA Dual Color Protein Standard III (SERVA)

4.1.4.3 Western Blot

Transferpuffer	Tris	48 mM
	Glycin	39 mM
	Methanol	15% (v/v)

4.1.4.4 Immundetektion

10x TBS-Tween	Tris	248 mM
	NaCl	1,37 M
	Tween 20	1% (v/v)
	pH = 7,6	

BSA-Blocklösung	TBS-Tween	1x
	BSA	1,5% (m/v)

Milch-Blocklösung	TBS-Tween	1x
	Milchpulver	1-5% (m/v)

10x NETG-Blocklösung	Tris	0,5 M
	NaCl	1,5 M
	EDTA	50 mM
	Tween 20	0,5% (v/v)
	Gelatine	0,4% (m/v)
	In ddH ₂ O in Mikrowelle lösen pH = 7,5	

Antikörper	Cofilin (D3F9) XP™ Rabbit mAb, Cell Signalling # 5175	
	GAPDH (14C10) Rabbit mAb, Cell Signalling # 2118	
	NDK (D18F10) Rabbit mAb, Cell Signalling # 5389	
	α-Rabbit-IgG-Alexa488, Dianova # 111-545-003	

4.2 Methoden

4.2.1 Gesamt-RNA Isolierung

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurden zwei unterschiedliche Isolierungsmethoden angewendet. Die Gesamt-RNA Isolierung aus den FFPE-Gewebeblöcken erfolgte mithilfe des *miRNeasy FFPE Kit* von *Qiagen*. Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurde das *miRNA mini Isolationskit* von *Qiagen* verwendet.

4.2.1.1 Gesamt-RNA Isolierung aus Primärtumoren und Normalgeweben

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Tumor- bzw. Normalgeweben erfolgte mittels des *miRNeasy FFPE Kits* von *Qiagen* nach Herstellerangaben. Dafür wurden zunächst die Tumorareale mit einem Tumorzellgehalt von über 85% nach HE-Färbung ausgewählt. Aus den archivierten FFPE-Gewebeblöcken wurden sowohl aus den Tumorarealen als auch aus den Normalgeweben 10 x 7 µm dicke Paraffinschnitte mit Hilfe eines Mikrotoms angefertigt und jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Im ersten Schritt wurde jeweils 1 ml Ethanol zugegeben, die Probe für 10 s auf einem Rüttler kräftig geschüttelt und bei 13.400 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, ohne das Zellpellet zu zerstören. Damit sich das Paraffin vollständig vom Gewebe löst, wurde im nächsten Schritt 1 ml Xylol unter einem Abzug hinzugegeben. Die Durchmischung und Zentrifugation wurde wie im vorangegangenen Arbeitsschritt wiederholt und der Überstand vorsichtig abgenommen. Um das Xylol nun restlos vom Gewebe zu entfernen, wurde anschließend nochmals 1 ml Ethanol zur Probe gegeben. Darauffolgendes Mischen und Zentrifugieren für 2 min bei 13.400 rpm sorgten dafür, dass sich die für die nächsten Vorgänge benötigten Zellbestandteile als Zellpellet am Boden des Reaktionsgefäßes abgesetzt hatten. Der Überstand wurde mit einer kleinen Pipette weitestgehend entfernt. Die Proben wurden mit offenem Deckel bei 37 °C im Heizblock inkubiert, bis sich das restliche Ethanol verflüchtigt hatte. Die aufbereiteten Proben wurden nun in 240 µl PKD Puffer gelöst. Nach Zugabe von 10 µl Proteinase K wurden die Proben bei 56 °C für 15 min inkubiert und im Folgenden bei 80 °C für 15 min inkubiert. Wichtig war hierbei, dass die Proben bei der Temperaturumstellung des Heizblockes von 56 °C auf 80 °C bei Raumtemperatur belassen wurden. Nach abgelaufener Zeit erfolgte eine Eisinkubation für 3 min. Die Proben wurden anschließend für 15 min bei 13.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und einer DNase I Behandlung über 15 min bei Raumtemperatur unterzogen, um eventuell vorhandene genomische DNA abzubauen. Anschließend wurden 500 µl RBC Puffer hinzugegeben und das Reaktionsgefäß kurz geschüttelt. Das Lysat wurde restlos in 1.750 µl Ethanol überführt und

die Proben wurden so lange geschwenkt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Daraufhin erfolgte die Überführung von 700 µl in ein Säulenreaktionsgefäß, welches für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Der Durchfluss am Boden des Säulenreaktionsgefäßes wurde verworfen und wiederum 700 µl Probe auf das Säulenreaktionsgefäß gegeben. Dieser Arbeitsschritt wurde so oft wiederholt, bis das Lysat-Ethanol-Gemisch vollständig zugegeben worden war. Daraufhin folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE Puffer, in welchen Salze, Proteine und andere zelluläre Bestandteile von der Filtermembran entfernt wurden. Danach wurde der Filter auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und die isolierten RNA-Moleküle mit 30-50 µl nuclease-freiem Wasser bei 13.400 rpm für 1 min eluiert. Die isolierten Proben wurden bei -20 °C eingefroren.

4.2.1.2 Gesamt-RNA Isolierung aus Tumorzelllinien

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellen der Zelllinien erfolgte mit Hilfe des *miRNA mini Isolationskit* der Firma *Qiagen* nach Herstellerangaben. Hierfür wurden jeder Probe 700 µl *Qiazol Lysis Puffer* von *Qiagen* unter dem Abzug hinzugegeben. Die Proben wurden danach geschüttelt und kurz herunterzentrifugiert. Das Gewebe wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine Separation der RNA-Moleküle zu erreichen, erfolgte eine Zugabe von 140 µl Chloroform (ebenfalls unter dem Abzug). Es erfolgte eine Durchmischung für 15 s und eine Inkubation für 2-3 min bei Raumtemperatur. Im nächsten Arbeitsschritt erfolgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 12.000 rpm bei 4 °C. Nach der Zentrifugation bildeten sich in den Proben drei unterschiedliche Phasen: eine obere wässrige Phase, welche die RNA-Bestandteile enthielt, eine mittlere Phase aus DNA bestehend und eine untere Phase, welche die Proteine und Fette beinhaltete. Nun galt es darauf zu achten, dass lediglich die obere wässrige Phase mit der gewünschten Gesamt-RNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde (ca. 350 µl).

Dem Gemisch wurden anschließend 525 µl Ethanol hinzugefügt. Davon wurden 700 µl auf ein Säulenreaktionsgefäß überführt und für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Vorgang wurde mit dem restlichen Probenvolumen wiederholt. Der Durchfluss wurde verworfen und es wurden wiederum zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE Puffer durchgeführt. Im Anschluss wurde der Filteranteil des Säulenreaktionsgefäßes auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Dieser Vorgang diente der Filtertrocknung in der Säule. Danach wurde der Filter auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und die isolierten RNA-Moleküle mit 30-50 µl nukleasefreiem Wasser (je nach Probenvolumen) bei 13.400 rpm für 1 min eluiert. Die RNA-Konzentrations- und Qualitätsmessung erfolgte nach Punkt 4.2.2.. Die isolierten Proben konnten für die weiteren Arbeitsschrte bei -20 °C eingefroren werden.

4.2.2 Gesamt-RNA Konzentrations- und Qualitätsmessung

Die Konzentration und Reinheit der isolierten Gesamt-RNA wurde mithilfe des *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometers* gemessen. Zur Initialisierung des Gerätes wurde 10 µl nuclease-freies Wasser auf die Messoberfläche gegeben. Danach erfolgte eine Nullpunkteinstellung mit 1,5 µl nuclease-freiem Wasser. Für die Messung wurde die Probe ggf. aufgetaut, kurz durchmischt und 1,5 µl auf die Messoberfläche gegeben.

Der verwendete *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer* ist in der Lage, die Lichtabsorption von Nukleinsäurelösungen bei einer Wellenlänge von 260/280 nm bzw. 260/230 nm photometrisch zu bestimmen. Das Verhältnis der Absorption von 260/280 nm wird zur Bestimmung der Reinheit der RNA-Probe verwendet. Das bevorzugte Verhältnis von 260/280 nm liegt dabei zwischen 1,8 und 2,0. Sollte das Verhältnis wesentlich niedriger liegen, weist dies auf eine Verunreinigung mit Proteinen, Phenol oder anderen Lösungsmitteln hinweisen, welche bei 280 nm ebenfalls stark absorbieren.

Zusätzlich wird die Absorption bei 260/230 nm gemessen. Das Verhältnis liegt dabei in der Regel zwischen 2,0 und 2,2. Ist dieses Verhältnis wesentlich niedriger, ist dies auf eine mögliche Verunreinigung mit Lösungsmitteln zurückzuführen, die bei einer Wellenlänge von 230 nm absorbieren. Dies wären beispielsweise EDTA, Kohlenhydrate und Phenol. Nachfolgende Abbildung 12 veranschaulicht eine exemplarische Messung.

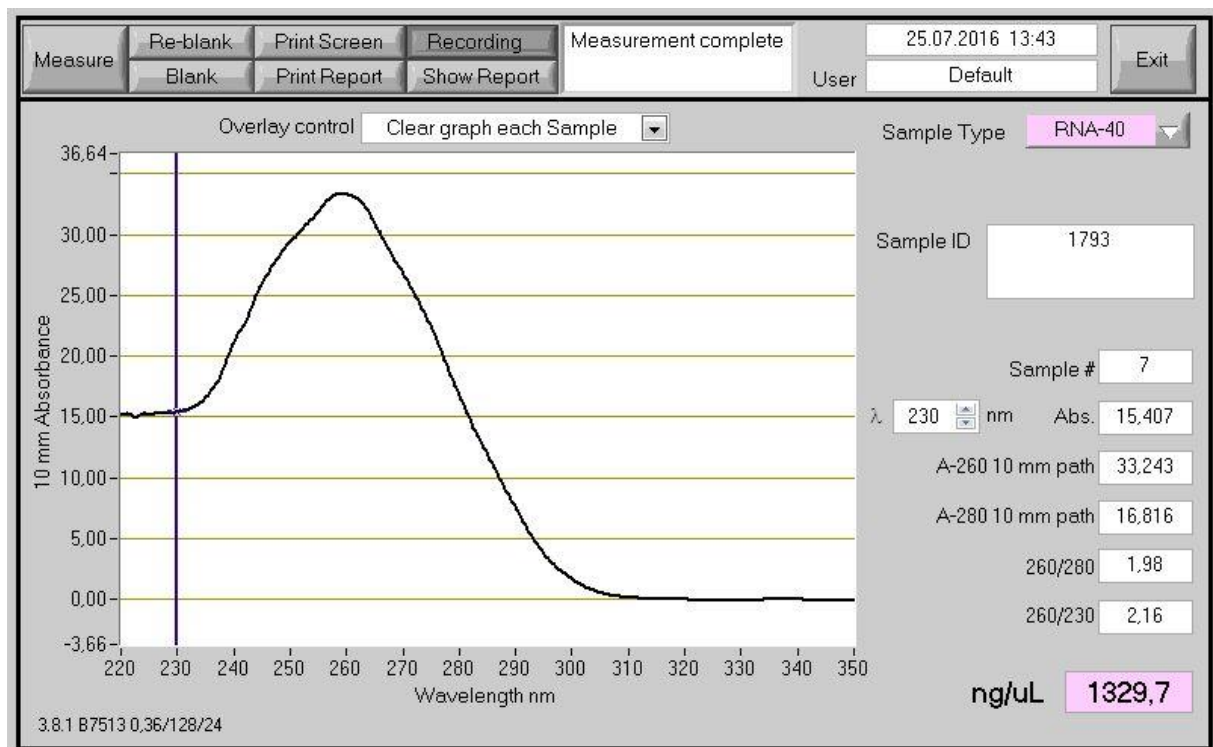


Abbildung 12: Typischer RNA Peak bei einer Messung durch den NanoDrop™ Spectrophotometer.

4.2.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Um die unterschiedliche Expression der miRNA in den einzelnen Proben nachweisen zu können, wurde eine Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) angewandt. Dabei wurde die isolierte Gesamt-RNA zuerst mit einem speziellen Enzym, der Reversen Transkriptase (RT), in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Bei diesem Vorgang wird ein ergänzender Strang hergestellt. Die cDNA kann nun als DNA-Ausgangssequenz in der qPCR vervielfältigt werden.

Im ersten Arbeitsschritt der reversen Transkription erfolgte die Vorbereitung des *RT-Primerpools*. Dafür wurden die 5x *RT-Primer*, welche jeweils spezifisch für die beiden miRNAs miR-30e-3p und miR-139-5p und die Referenz RNU48 sind, aus dem *Taq-Man® MicroRNA Assay* von *Applied Biosystems* verwendet (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Spezifische Sequenzen der miRNA-Primer.

miRNA	Primersequenz
RNU48	GATGACCCCAAGGTAAGTCTGAGTGTGTCGCTGATGCCATCACCGCAGCGCTCTGACC
miR-30e-3p	CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC
miR-139-5p	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAG

Die Konzentration jedes *RT-Primers* sollte 0,05x im Endvolumen des *RT-Primerpools* betragen. Um 200 µl *RT-Primerpool* herzustellen, mussten demnach 2 µl pro *RT-Primer* in ein Reaktionsgefäß gegeben werden und mit 194 µl nuclease-freiem Wasser aufgefüllt werden. Ein Beispiel zur Herstellung des *Primerpools* zeigt nachfolgende Tabelle 15.

Tabelle 15: Beispiel zur Herstellung eines Primerpools.

Anzahl der Primer	Primer Pool Volumen	Wasser	Totales Volumen
3	6 µl (2µl pro Primer)	194 µl	200 µl

Nach Herstellung des *RT-Primerpools* erfolgte das Ansetzen eines *RT-Mastermixes* mithilfe des *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* von *Applied Biosystems*. Die Reagenzien des *RT-Mastermixes* sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Reaktionsansatz zur cDNA Herstellung pro Probe.

Material	Menge
Nuclease freies Wasser	1,01 µl
100 mM dNTPs	0,30 µl
10 x RT Puffer	1,50 µl
RNAse Inhibitor, 20 U/µl	0,19 µl
RT Primer Pool	6 µl
Multiscribe RT, 50 U/µl	3 µl
Total	12 ml

Pro Probenansatz wurden anschließend 3 µl RNA mit einer Konzentration von 33,3 ng/µl und 12 µl RT-*Mastermix* in ein Reaktionsgefäß gegeben. Der Reaktionsansatz für die RT-PCR hatte somit ein Gesamtvolumen von 15 µl. Die Proben wurden kurz durchmischt, herunterzentrifugiert und dann für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die RT-PCR im *Thermocycler* nach dem Programm aus Tabelle 17.

Tabelle 17: Programm des Thermocyclers.

Zeit in min	Temperatur in °C	Vorgang
30	16	Primerhybridisierung
30	42	Elongation
5	85	Denaturierung
∞	4	

Nach Beendigung des Programms lag die Gesamt-RNA mit einem Doppelstrang als cDNA vor und die Proben konnten bei -20 °C gelagert werden.

4.2.4 Quantitative Echtzeit-polymerase chain reaction (qPCR)

Bei der qPCR kann mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen die Zunahme von PCR-Produkten in Echtzeit verfolgt werden. Um dies zu ermöglichen, wird die PCR im Lightcycler unter Verwendung spezifischer *TaqMan*® Sonden und spezifischen Primern durchgeführt. Die Besonderheit der *TaqMan*® Sonden liegt darin, dass diese die spezifische Sequenz des zu untersuchenden Primers enthalten und somit an die zu amplifizierende Zielsequenz binden können. Zusätzlich enthalten die Sonden einen Reporter-Farbstoff am 5'-Ende und einen Quencher-Farbstoff am 3'-Ende. Um die Fluoreszenz des Reportermoleküls freizusetzen wird die Sonde vom 5'-Ende her durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase von der Zielsequenz verdrängt und abgebaut und somit der Reporter vom Quencher getrennt (siehe Abbildung 13). Erst jetzt kann die Fluoreszenz des Reportermoleküls detektiert werden. Die Zunahme der Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zu der Entstehung von PCR-Produkten (Schütt and Bröker 2011).

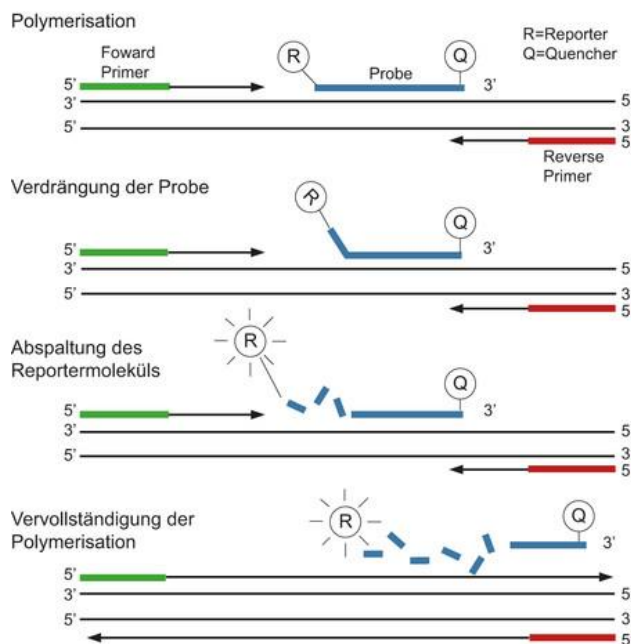


Abbildung 13: Prinzip der Taq-Man Sonde (Quelle: Real-Time PCR n.d.)

Für die Amplifikation der hergestellten cDNA wurde für jede einzelne miRNA bzw. ihren Primer ein PCR-Masteransatz benötigt. Dieser setzte sich nach der Anleitung in Tabelle 18 zusammen.

Tabelle 18: PCR-Mastermixansatz.

Primer (20x)	0,5 µl
Gene Mastermix	5 µl
Nuclease freies Wasser	3,5 µl
Total	9 µl

Jede Probe wurde in 3 technischen Replikaten angesetzt und pro Primer wurden 2 Negativkontrollen (non template control - NTC) auf eine *96-Well-Platte* aufgetragen. Zu jedem Ansatz wurden 1 µl aus der zu amplifizierenden Probe mit der vorherigen hergestellten cDNA bzw. nukleasefreies Wasser hinzugefügt. Als Referenz wurde für jede Probe die RNU48 verwendet, welche bereits in den vorangegangenen Studien eine stabile Expression aufwies. Die Platte wurde mit einer Folie luftdicht verschlossen und für 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Amplifikation für 40 Zyklen im *StepOnePlus™* System von *Applied Biosystems* nach einem festgelegten Amplifikationszyklus, welches in Tabelle 19 beschrieben wird.

Tabelle 19: Amplifikationszyklus der qPCR.

Aktivierung des AmpliTaq PCR Gold Enzyms			
Schritt	Hold	40 Zyklen	
Zeit	10 min	15 s	60 s
Temperatur	95 °C	95 °C	60 °C
Vorgang	Enzymaktivierung	Denaturierung	Annealing und Extension

Nach Ablauf der PCR werden die unterschiedlichen *Crossing-point*-Werte (CP-Werte) verglichen. Der CP-Wert gibt dabei den Wert an, an dem die Probe aus der Hintergrundfluoreszenz hervortritt. Dieser sollte zwischen 20-35 Zyklen liegen.

4.2.4.1 Ermittlung der Primereffizienzen

Um die Ergebnisse aus der qPCR statistisch auswerten zu können, erfolgte die Ermittlung der Primereffizienzen. Die ermittelte Effizienz gibt die Vervielfältigung der RNA pro Zellzyklus an. Wenn die gesamte RNA pro Zyklus verdoppelt wird liegt dieser Wert bei 2,0. Die Primereffizienzen wurden durch eine 10er Verdünnungsreihe mit Hilfe der qPCR ermittelt.

4.2.5 Zellkulturen

Die folgenden Methoden wurden unter einer Sterilwerkbank und mit sterilisierten oder steril gelieferten Materialien durchgeführt. Zur Desinfizierung vor und nach dem Gebrauch wurde 70%iges Ethanol verwendet.

4.2.5.1 Auftauen adhärenter Zellen aus Stickstoff

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zelllinien wurden mit Hilfe von 8 ml Kulturmedium aufgetaut. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 3 min bei 1.100 rpm, wodurch die Zellen sedimentiert wurden. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension konnte nun in eine mit frischem Medium vorbereitete Zellkulturflasche überführt werden (10 ml Gesamtvolumen bei einer 75 cm² großen Kulturflasche und 2 ml Gesamtvolumen bei einer 25 cm² Kulturflasche).

4.2.5.2 Subkultivierung adhärenter Zellen mit Trypsin/EDTA

Zur Subkultivierung von Zellen wurde zunächst das Zellkulturmedium abgesaugt. Darauf folgte eine Waschung der Zellen mit PBS (5 ml bei 75 cm² und 2 ml bei 25 cm²), um die Reste des Mediums aus der Kulturflasche zu entfernen. Damit die Zellen sich vom Flaschenboden lösten, wurde im nächsten Arbeitsschritt der Monolayer mit Trypsin in Kombination mit EDTA überschichtet (1 ml bei 75 cm² und 0,5 ml bei 25 cm²). Trypsin ist ein proteolytisches Enzym, welches die Bindung zwischen zellulären Rezeptoren angreift und somit zu einer gewünschten Zellvereinzelung führt. Zusätzlich destabilisiert das Calcium, welches sich im EDTA befindet, die Ca²⁺ abhängigen Bindungen zwischen den einzelnen Proteinen. Um optimale Arbeitsbedingungen für das Trypsin/EDTA zu schaffen, wurde die Kulturflasche für einige Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Zellkulturflaschen wurden optisch kontrolliert, ob sich die Zellen abgelöst hatten. Im Folgenden wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von Kulturmedium gestoppt (3 ml bei einer 75 cm² großen Kulturflasche und 2 ml bei einer 25 cm² großen Kulturflasche). Anschließend wurde die Zellsuspension vollständig in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 3 min bei 1.100 rpm zentrifugiert. Nach Zentrifugation konnte der Überstand abgesaugt werden und das Zellpellet mit 2 ml Kulturmedium resuspendiert werden. Nach diesem Schritt war es möglich, eine Zellzählung durchzuführen. War dies nicht erwünscht, konnte ein Anteil der Suspension mit der geschätzten Zellzahl direkt in ein neues Zellkulturgefäß übernommen und mit frischem Kulturmedium aufgefüllt werden (4,5 ml bei 25 cm² bzw. 12 ml bei 75 cm²).

4.2.5.3 Zellzählung und Aussaat

War eine Zellzählung notwendig, erfolgte dies mit dem Zellzählsystem *Luna*TM. Hierfür wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau in eine Zählkammer gegeben. Für die Trans-

fektion der Zellen auf eine *6-Well-Platte* wurden die Zellen so ausgesät, dass sie nach 3 Tagen zu 60-70% konfluent waren. Hierfür wurden 30.000 Zellen in 2 ml Kulturmedium in einem *Well* eingesetzt. Für die eigentliche Transfektion wurden die Zellen im Brutschrank aufbewahrt. Spätestens 24 h nach der Aussaat wurde den Zellen für 4 h ein FKS-freies Kulturmedium hinzugefügt, um später eine bessere Aufnahme der miRNA zu erzielen.

4.2.5.4 Transfektion

Für einen Transfektionsansatz wurde ein Reaktionsgefäß mit 2 µl miRNA miR-30e-3p und 198 µl *Opti-MEM*® und ein weiteres Reaktionsgefäß mit 1 µl DharmaFECT und 199 µl *Opti-MEM*® vorbereitet. Die Reagenzien wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Inhalt der beiden Reaktionsgefäße wurde daraufhin vereinigt und nochmals für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, sodass die miRNA mit dem Transfektionsmedium Lipidkomplexe ausbilden konnte. Für eine *MOCK*-Kontrolle wurde der gleiche Ansatz vorbereitet, jedoch ohne miRNA, das Volumen der miRNA wurde mit *Opti-MEM*® aufgefüllt. Im nächsten Arbeitsschritt wurden jedem Reaktionsgefäß 1.600 µl Medium hinzugefügt. Das alte Medium wurde aus der *6-Well-Platte* abgesaugt und je 2 ml der Reagenz pro *Well* hinzugefügt. Die Zellen wurden im Brutschrank gelagert und es erfolgte ein Kulturmediumwechsel nach maximal 24 h.

4.2.5.5 Zellernte

4.2.5.5.1 Zellernte für eine Gesamt-RNA Isolierung

Zur Ernte von Zellen wurde zunächst das Zellkulturmedium abgesaugt. Darauf folgte eine Waschung der Zellen mit 1 ml PBS pro *Well*. Damit die Zellen sich vom Flaschenboden lösen, wurde im nächsten Arbeitsschritt der Monolayer in jedem *Well* mit jeweils 0,5 ml Trypsin/EDTA überschichtet, im Folgenden mit 1 ml Kulturmedium abgespült und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Es erfolgten zwei Zentrifugationsschritte bei 1.100 rpm für 3 min, in denen das Zellpellet mit jeweils 1 ml PBS gewaschen wurde. Das Zellpellet konnte nun bei -80 °C eingefroren werden oder direkt zur weiteren Gesamt-RNA-Isolierung, wie in Punkt 4.2.1.2. beschrieben, verwendet werden.

4.2.5.5.2 Zellernte für den Proteinnachweis

Wurde die *6-Well-Platte* für die Proteinbestimmung benötigt, so wurde das alte Medium abgesaugt und jedes *Well* mit 2 ml PBS gewaschen. Im folgenden Schritt wurden 100 µl Lysepuffer bestehend aus 99 µl *CHAPS-Puffer* und 1 µl Protease-Inhibitor-Mix auf jedes einzelne *Well* gegeben. Die Proben wurden auf Eis gestellt, mit einem Schaber abgeerntet und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat konnte nun ebenfalls bei -80 °C eingefroren

werden oder ggf. zum direkten Proteinnachweis verwendet werden. Hierfür wurden die Proben bei 4°C für 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann erfolgte eine Proteinkonzentrationsmessung bei einer Extinktion von 280 nm mithilfe des *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometers*.

4.2.6 Proteinnachweis

4.2.6.1 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE wurden die Proteine, welche zuvor durch die Zellyse gewonnen worden waren, nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Dafür wurde sowohl ein Trenngel, als auch ein Sammelgel gegossen (Rezepturen siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Rezept für zwei Minigele.

Zutat	Trenngel				Sammelgel
	7%	10%	12,5%	15%	5%
30% Acrylamide/N,N'-Methylenbisacrylamide (A/B)	2,3 ml	3,3 ml	4,2 ml	5 ml	420 µl
ddH ₂ O doppelt destilliertes Wasser	5 ml	4 ml	3,1 ml	2,3 ml	1,4 ml
4x Trenngelpuffer//Sammelgelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	625 µl
10% Sodium bzw. Natriumdodecylsulfat (SDS)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	25 µl
TEMED N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamin	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	3,75 µl
10% APS Amoniumpersulfat	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	15 µl

Zur Vorbereitung wurden die Proben im Verhältnis 1:6 mit 6x Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 80 °C erhitzt. Für die Elektrophorese wurde der Laufpuffer in die Kammer eingefüllt und die Geltaschen mit den Proben und einem Proteinstandard zur Kontrolle beladen. Die Proteine wurden bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA aufgetrennt. Die Laufzeit dauerte solange, bis die Unterseite des Gels erreicht war (ca. 60 min).

4.2.6.2 Western Blot

Nachdem die Proteine zuvor nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt worden waren, war es nötig, durch einen Western Blot den Proteintransfer durch ein *semi-dry* Verfahren vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran durchzuführen. Dieser Transfer gab die Vorlage für die spätere Immundetektion.

Das zuvor bei der Elektrophorese verwendete Gel wurde für 10 min mit Transferpuffer equilibriert. Währenddessen wurden die Membran und das Filterpapier auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und die Membran für 15 s in Methanol aktiviert. Danach erfolgte ebenfalls die Equilibrierung der Membran und des Filterpapiers im Transferpuffer. Zur Durchführung des *Semi-Dry Blots* mussten das Filterpapier, die Membran und das Gel gemäß folgender Abbildung 14 angeordnet werden.



Abbildung 14: Aufbau des Western Blots (Quelle: Eisenreich 2009).

Die dabei eingeschlossenen Luftblasen wurden ausgewalzt. Der Proteintransfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 2 mA/cm² für 30 min.

4.2.6.3 Immundetektion

Der Proteinnachweis auf der PVDF-Membran erfolgte über Antikörper und Fluoreszenz. Hierfür musste zunächst eine Blockierung der freien Proteinbindungsstellen mit 3%iger BSA Blocklösung durchgeführt werden. Dies erfolgte für 20 min bei 37 °C. Nach der Blockierung erfolgte die Inkubation mit Primärantikörpern (Verdünnung 1:1000) bei 4 °C über Nacht. Es handelte sich dabei um Antikörper gegen Cofilin, NDK und GAPDH, dabei wurde die Membran entsprechend der Größe der nachzuweisenden Proteine geteilt. Die jeweiligen Membranen mussten nach der Primärantikörperbindung 3x für 5 min mit TBS-Tween Puffer gewaschen werden, bevor sie für 30 min bei Raumtemperatur mit dem α -Rabbit-IgG-Alexa488 Sekundärantikörper (Verdünnung 1:500) inkubiert wurden. Danach erfolgten 3 weitere Washungen für je 5 min. Die PVDF-Membranen wurden anschließend getrocknet.

4.2.7 Statistische Analysen

4.2.7.1 Auswertung der Expressionsanalysen

Die Ergebnisse der qPCR wurden mit dem *Relative Expression Software Tool* (REST) statistisch ausgewertet. Dies ist ein Softwareprogramm, welches die Real-Time-PCR-Ergebnisse zwischen zwei Probengruppen vergleichend auswertet. Zur Beurteilung der unterschiedlichen miRNA-Expression in metastasierten, nichtmetastasierten und normalen Geweben wurde ein p-Wert von $< 0,05$ festgelegt. Die Definition der unterschiedlichen Signifikanzlevel ist in nachfolgender Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Definierte Signifikanzlevel

p-Wert	Bezeichnung	Kennzeichnung
0,05 – 0,01	signifikant	*
< 0,01 – 0,001	hoch signifikant	**
< 0,001	höchst signifikant	***

Um die miRNA-Expression zwischen den metastasierten und nichtmetastasierten Tumoren zu vergleichen, wurden mit Hilfe des *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) Version IBM SPSS Statistics 24 *Boxplot*-Diagramme erstellt. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe des *Mann-Whitney-U*-Tests ausgewertet.

Zusätzlich wurde die Aussagekraft zum metastasierungsfreien Überleben und zum Gesamtüberleben anhand der unterschiedlichen miRNA-Expressionen mit *SPSS Statistics* analysiert. Hierfür wurden mit den normalisierten C_T-Werten *Receiver Operating Characteristic* (ROC)-Kurven erstellt. Mit Hilfe der ROC-Analyse wurde für die beiden miRNAs miR-30e-3p und miR-139-5p ein sogenannter Grenzwert (*Cut-Off* Wert) bestimmt. Dieser Wert gibt den Schwellenwert an, bei welchem möglichst präzise die metastasierten Tumoren von nichtmetastasierten Tumoren unterschieden werden können. Dieser *Cut-Off* Wert sollte eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen. Die Testqualität wurde durch Fläche unter der Kurve (AUC – *Area under curve*) berechnet. Eine optimal beschriebene Kurve sollte dabei eine Fläche über 0,8 aufweisen.

Durch die Bestimmung der *Cut-Off*-Werte, mit denen sich die metastasierten und nichtmetastasierten Tumoren unterscheiden ließen, konnten Kaplan-Meier-Analysen durchgeführt werden. Die Ermittlung der Signifikanz erfolgte durch den log-rank Test mit einem p-Wert von < 0,05.

Um die Unterschiede im metastasierungsfreien Überleben und Gesamtüberleben für jede miRNA abschätzen zu können, wurden Kaplan-Meier-Analysen verwendet.

4.2.7.2 Auswertung der Zellkultur

Um die durchgeführte Immundetektion zu überprüfen wurden die PVDF-Membranen mit dem Typhoon Scanner eingescannt und als Dateien im Graustufenformat ausgewertet. Dazu wurde die unterschiedliche Intensität der ausgewählten Banden mit der Software ImageJ 1.48v berechnet. Dabei wurde das Verhältnis von der miRNA-Bande zur Mock-Bande als interne Normalisierung festgelegt. Bei der Beladung wurde das Verhältnis zwischen der Proteinbande und der Bande von GAPDH normalisiert.

5 Ergebnisse

5.1 Validierung der Korrelation zwischen miRNA-Expression und Metastasierung

Basierend auf den Microarray-Analysen wurden aus den bereits identifizierten 14 Kandidaten-miRNAs die beiden miRNAs miR-30e-3p sowie miR-139-5p für die Validierung an einer unabhängigen Kohorte ausgewählt. Die Validierung erfolgte mit Hilfe einer qPCR-Analyse. Zunächst musste die Effizienz für die verwendeten Primer (miR-30e-3p, miR-139-5p und RNU48) ermittelt werden. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Effizienzen der verwendeten Primer für die miRNA miR-30e-3p und miR-139-5p sowie für die Referenz RNU48.

Primer	Effizienz
RNU 48	1,95
miR-30e-3p	1,87
miR-139-5p	1,91

Die Ergebnisse der qPCR wurden mit der REST Software statistisch ausgewertet. Dabei wurden die miRNA-Expressionslevel beider miRNAs in nichtmetastasierten (n = 48) und metastasierten (n = 54) Tumoren verglichen und Normalgewebe (n = 10) zur Kontrolle hinzugezogen. Die nachfolgende Abbildung gibt die Verteilung der normalisierten C_T -Werte für die miRNA miR-30e-3p wieder (siehe Abbildung 15).

Die Auswertung ergab für die miRNA miR-30e-3p höchstsignifikante Expressionsunterschiede ($p = 0,001$) zwischen den nichtmetastasierten und den metastasierten Tumoren. Die miRNA-Expression in metastasierten Tumoren war um das 1,5-fache gegenüber den nichtmetastasierten Tumoren herunterreguliert (Fold Change = 0,67). Zudem war der Vergleich von Normalgewebe und metastasierten Tumoren signifikant ($p = 0,016$). Die Expression war bei den metastasierten Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe um das 1,6-fache vermindert (Fold Change 0,638). Bei dem Vergleich der miRNA miR-30e-3p zwischen Normalgewebe und nichtmetastasierten Tumoren fand sich kein relevanter Expressionsunterschied ($p = 0,621$).

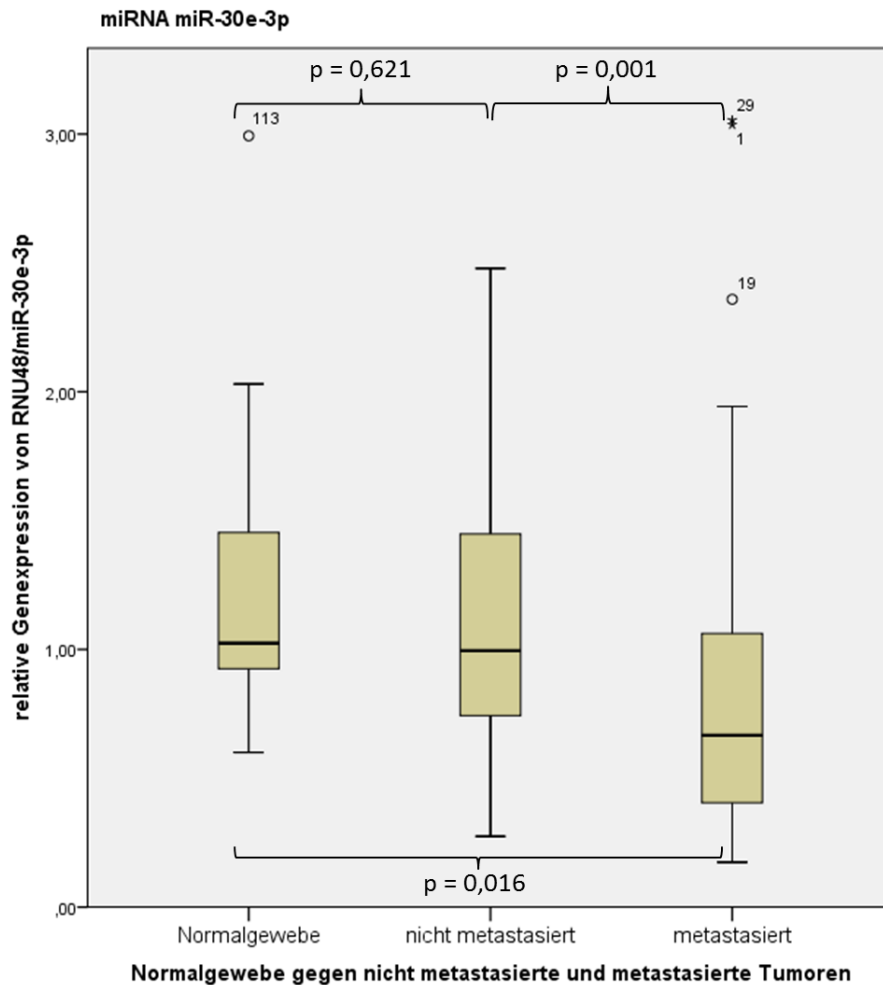


Abbildung 15: Vergleich der normalisierten Expressionswerte der miRNA miR-30e-3p zwischen Normalgeweben, nichtmetastasierten Tumoren sowie metastasierten Tumoren. Ermittlung des p-Wertes durch Mann-Whitney-U-Test.

In der nachfolgenden Tabelle 23 sind der Fold Change (1/Fold Change), die 95%-Konfidenzintervalle und die p-Werte für die miRNA miR-30e-3p zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 23: Zusammenfassung der Ergebnisse der miRNA miR-30e-3p aus den C_T-Werten der qPCR-Analyse.

Probengruppen	Fold Change (1/Fold Change)	95% KI	p-Wert
Normalgewebe gegen nichtmetastasierte Tumore	0,953 (-1,1-fach)	0,245 – 4,147	0,621
Normalgewebe gegen metastasierte Tumore	0,638 (-1,6-fach)	0,151 – 3,015	0,016
Nichtmetastasierte Tumore gegen metastasierte Tumore	0,67 (-1,5-fach)	0,112 – 3,460	0,001

Für die miRNA miR-139-5p wurde zwischen den nichtmetastasierten Tumoren und den metastasierten Tumoren ein höchst signifikanter ($p < 0,001$) Expressionsunterschied nachgewiesen. Die miRNA-Expression in den metastasierten Tumoren war um das 2,1-fache im Vergleich zu den nichtmetastasierten Tumoren herunterreguliert. Die Gegenüberstellung zwischen Normalgeweben und nichtmetastasierten Tumoren wies keine signifikante ($p = 0,51$) differentielle Expression auf. Bei dem Vergleich der Normalgewebe mit den metastasierten Tumoren war das Ergebnis ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,098$). Die nachfolgende Abbildung gibt die Verteilung der normalisierten C_T-Werte für die miRNA miR-139-5p wieder (siehe Abbildung 16).

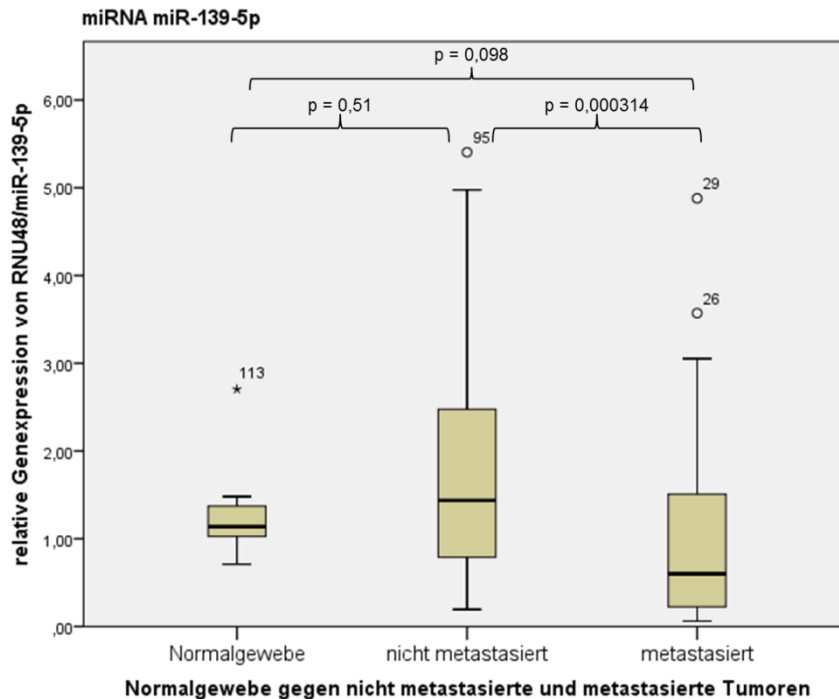


Abbildung 16: Vergleich der normalisierten Expressionswerte zwischen Normalgeweben, nichtmetastasierten Tumoren sowie metastasierten Tumoren der miRNA miR-139-5p. Ermittlung des p-Wertes durch Mann-Whitney-U-Test.

Die nachfolgende Tabelle 24 zeigt eine Übersicht über den Fold Change (1/Fold Change), die 95%-Konfidenzintervalle und die p-Werte für die miRNA miR-139-5p.

Tabelle 24: Zusammenfassung der Ergebnisse der miRNA miR-139-5p aus den C_T -Werten der q-PCR-Analyse.

Probengruppen	Fold Change (1/Fold Change)	95% KI	p-Wert
Normalgewebe gegen nichtmetastasierte Tumore	1,098 (-0,91-fach)	0,198 – 4,236	0,51
Normalgewebe gegen metastasierte Tumore	0,519 (-1,9-fach)	0,069 – 3,257	0,098
Nichtmetastasierte Tumore gegen metastasierte Tumore	0,473 (-2,1-fach)	0,043 – 5,864	< 0,001

5.2 Korrelation der Ergebnisse zu den klinischen Parametern

5.2.1 ROC-Analysen

Mit Hilfe einer ROC-Analyse wurde der Cut-Off Wert zur Differenzierung zwischen nichtmetastasierten und metastasierten Tumoren bestimmt. Für die miR-30e-3p betrug die Sensitivität 75% und die Spezifität 61%. Bei der miR-139-5p wurde eine Sensitivität von 71% und eine Spezifität von 63% ermittelt (siehe Tabelle 25). Beide miRNAs wiesen bei der ROC-Analyse höchst signifikante Werte ($p < 0,001$) auf (siehe Abbildung 17).

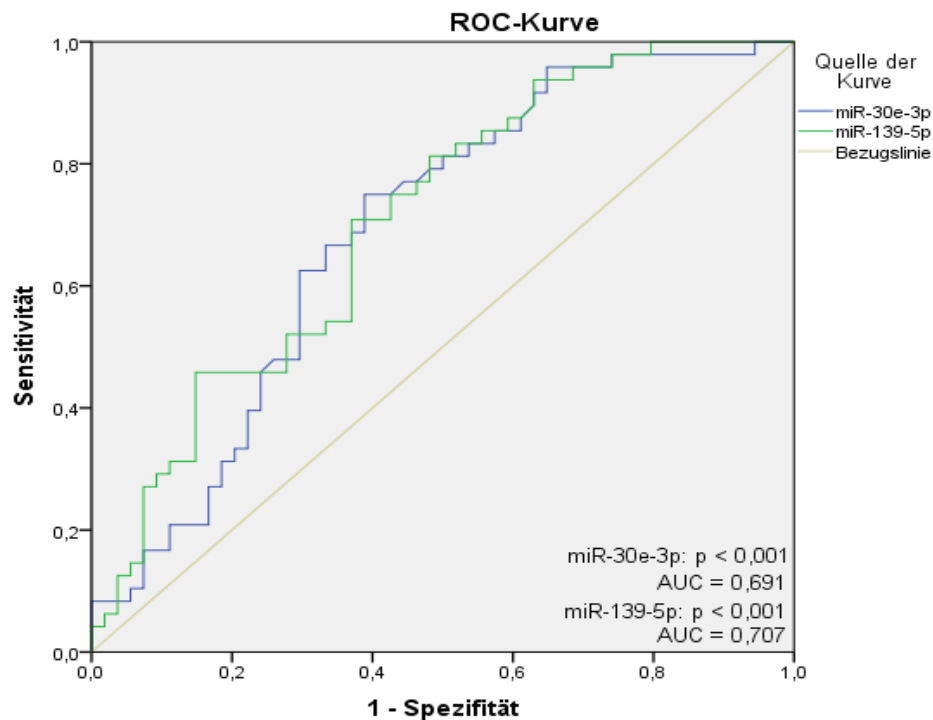


Abbildung 17: ROC-Kurve zur Ermittlung des Grenzwertes für die Unterscheidung von metastasierten und nichtmetastasierten Tumoren anhand der miRNA-Expression der beiden miRNAs miR-30e-3p und miR-139-5p.

Tabelle 25: Mittels ROC-Analyse ermittelte Werte zum Vergleich der Metastasierungsereignisse von metastasierten und nichtmetastasierten Tumoren.

miRNA	AUC	p-Wert	Sensitivität	Spezifität	Cut-off	Standardfehler
miR-30e-3p	0,691	0,000927	75%	61%	0,076000	0,052441
miR-139-5p	0,707	0,000314	71%	63%	0,08195	0,050748

5.2.2 Korrelation der Ergebnisse zum metastasierungsfreien Überleben mittels Kaplan-Meier-Analysen

Unter Verwendung der Cut-Off-Werte, mit denen sich die metastasierten und nichtmetastasierten Tumoren unterscheiden ließen, wurden Kaplan-Meier-Analysen durchgeführt. In die Analyse zum metastasierungsfreien Überleben wurden nur Tumore eingeschlossen, die zum Zeitpunkt der Diagnose keine Metastasen aufwiesen (insgesamt 48 nichtmetastasierte und 38 metachron metastasierte Tumore).

Eine verminderte Expression der miR-30e-3p war höchst signifikant ($p < 0,001$) mit einem kürzeren metastasierungsfreien Überleben assoziiert (siehe Abbildung 18). Die geschätzte Metastasierungsrate bei einer erhöhten miRNA-Expression betrug nach zehn Jahren 35%. Dagegen zeigte sich bei einer erniedrigten miRNA-Expression eine geschätzte Metastasierungsrate von 72%. Das mediane metastasierungsfreie Überleben für eine erniedrigte Expression der miRNA miR-30e-3p wurde auf 54 Monate geschätzt (siehe Tabelle 26).

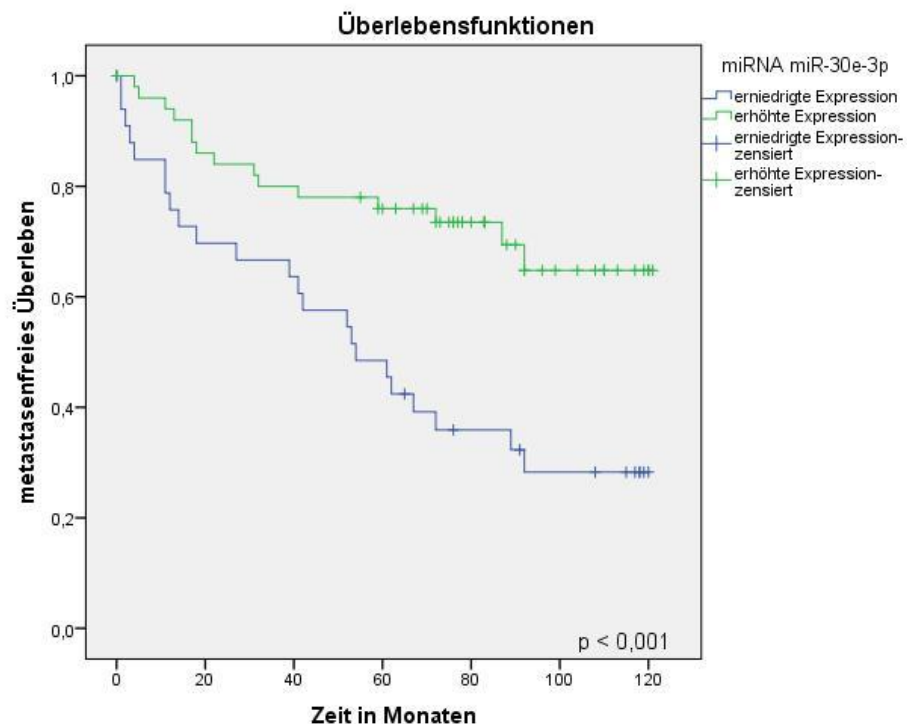


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Analyse zum metastasierungsfreien Überleben für die miRNA miR-30e-3p. Die Ermittlung der Signifikanz erfolgte durch den log-rank Test.

Tabelle 26: Medianes metastasierungsfreies Überleben in Abhängigkeit von der miR-30e-3p-Expression.

miRNA-Expression	Median	Standardfehler	95% Konfidenzintervall
erniedrigt	54 Monate	11,484	31,492 – 76,508
erhöht	im Beobachtungszeitraum nicht erreicht	-	-

Ebenso ist auch eine verminderte miRNA-Expression der miR-139-5p mit einer hoch signifikant ($p = 0,005$) erhöhten Metastasierungsrate assoziiert (siehe Abbildung 19). Die geschätzte Metastasierungsrate bei einer erhöhten miR-139-5p-Expression betrug nach zehn Jahren 36%. Dagegen zeigte sich bei einer erniedrigten miRNA-Expression eine geschätzte Metastasierungsrate von 67%. Das mediane metastasierungsfreie Überleben bei einer erniedrigten miRNA miR-139-5p-Expression ergab 61 Monate (siehe Tabelle 27).

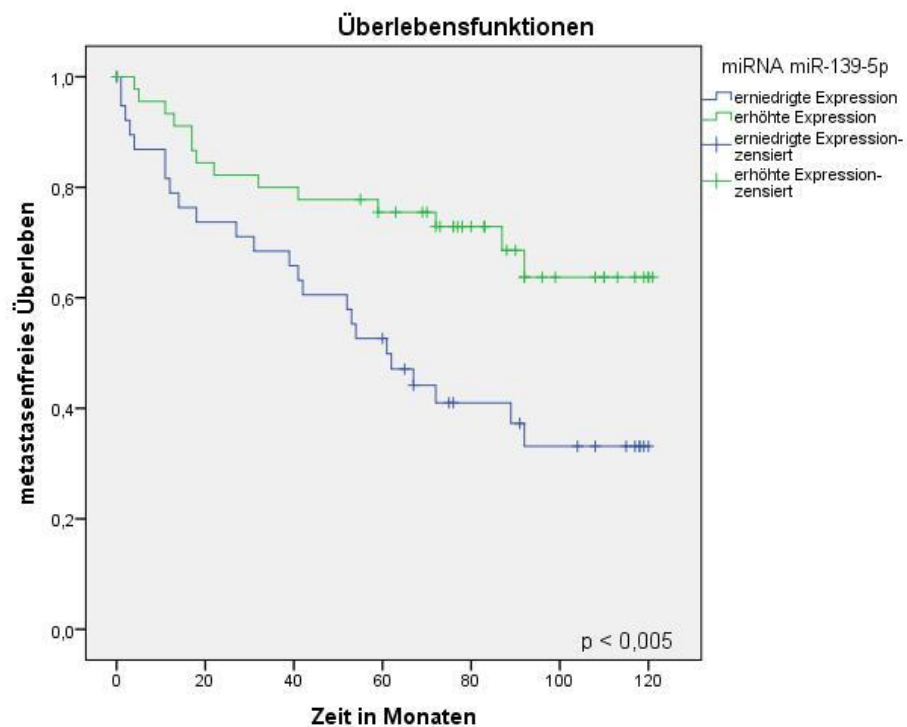


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Analyse zum metastasierungsfreien Überleben bei miRNA miR-139-5p. Die Ermittlung der Signifikanz erfolgte durch den log-rank Test.

Tabelle 27: Medianes metastasierungsfreies Überleben in Abhängigkeit von der miR-139-5p-Expression.

miRNA-Expression	Median	Standardfehler	95% Konfidenzintervall
erniedrigt	61 Monate	10,245	40,921 – 81,079
erhöht	im Beobachtungszeitraum nicht erreicht	-	-

5.2.3 Korrelation der miRNA-Expression zum Gesamtüberleben mittels Kaplan-Meier-Analysen

Im nächsten Schritt wurden Kaplan-Meier-Analysen für das Gesamtüberleben erstellt. Die Auswertung ergab sowohl für die miR-139-5p als auch für die miR-30e-3p keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 20 und 21).

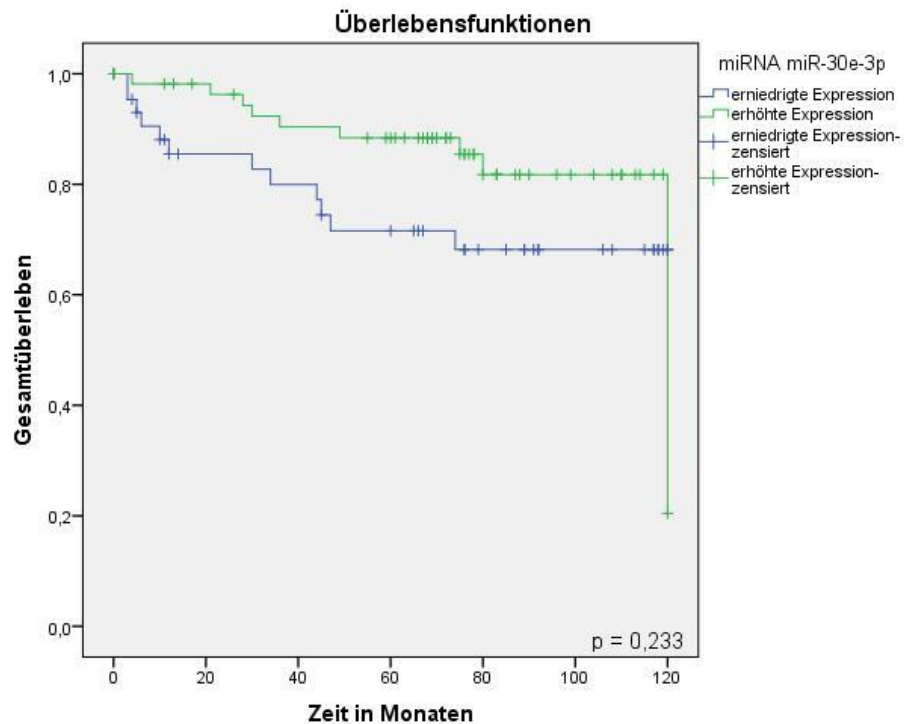


Abbildung 20: Gesamtüberlebenszeit für die unterschiedlichen Expressionslevel der miRNA miR-30e-3p. Die Ermittlung der Signifikanz erfolgte durch den log-rank Test.

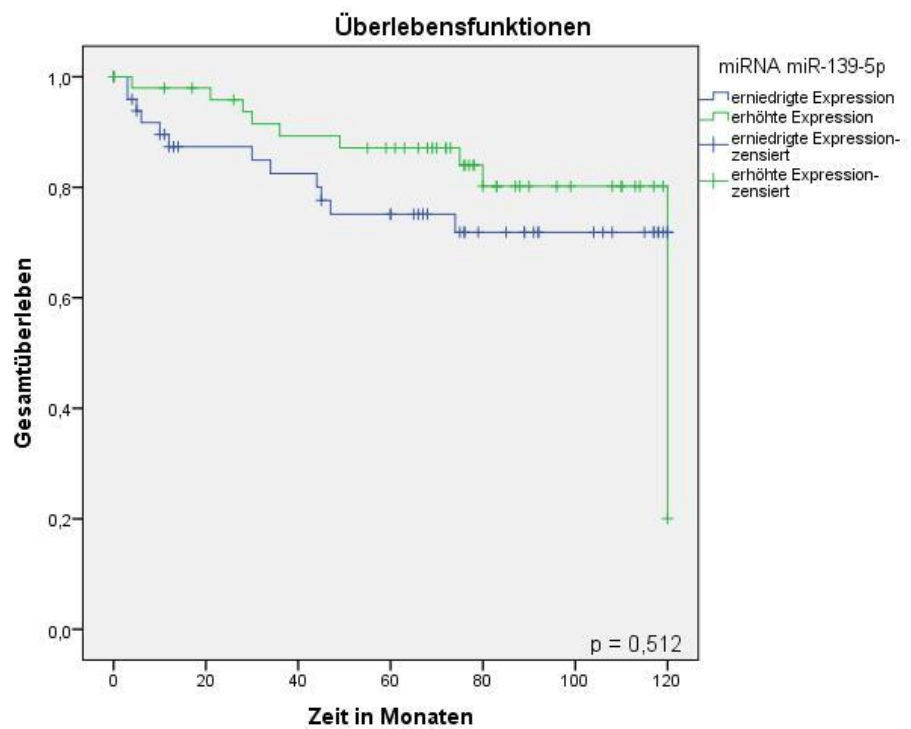


Abbildung 21: Gesamtüberlebenszeit für die unterschiedlichen Expressionslevel der miRNA miR-139-5p. Die Ermittlung der Signifikanz erfolgte durch den log-rank Test.

5.2.4 Metastasierungsrisiko bei organbegrenzten Tumoren

5.2.4.1 Korrelation der Ergebnisse zum metastasierungsfreien Überleben mittels Kaplan-Meier-Analysen

In einer weiteren Analyse wurde das Metastasierungsrisiko in der Gruppe der organbegrenzten Tumoren untersucht. Als organbegrenzt gelten die Tumore der Kategorien pT1 und pT2. Eine erniedrigte miR-30e-3p-Expression korreliert signifikant mit dem metastasierungsfreien Überleben (siehe Abbildung 22). Bei einer erniedrigten miRNA-Expression werden schätzungsweise 66% der Patienten eine Metastasierung innerhalb von zehn Jahren Nachbeobachtung aufgewiesen haben. Dagegen wäre nach zehn Jahren Nachbeobachtungszeit bei schätzungsweise 36% der Patienten mit einer erhöhten miRNA-Expression eine Metastasierung zu erwarten. Das mediane metastasierungsfreie Überleben bei einer erniedrigten Expression der miRNA miR-30e-3p betrug nach Auswertung der Kaplan-Meier-Analysen 61 Monate (siehe Tabelle 28).

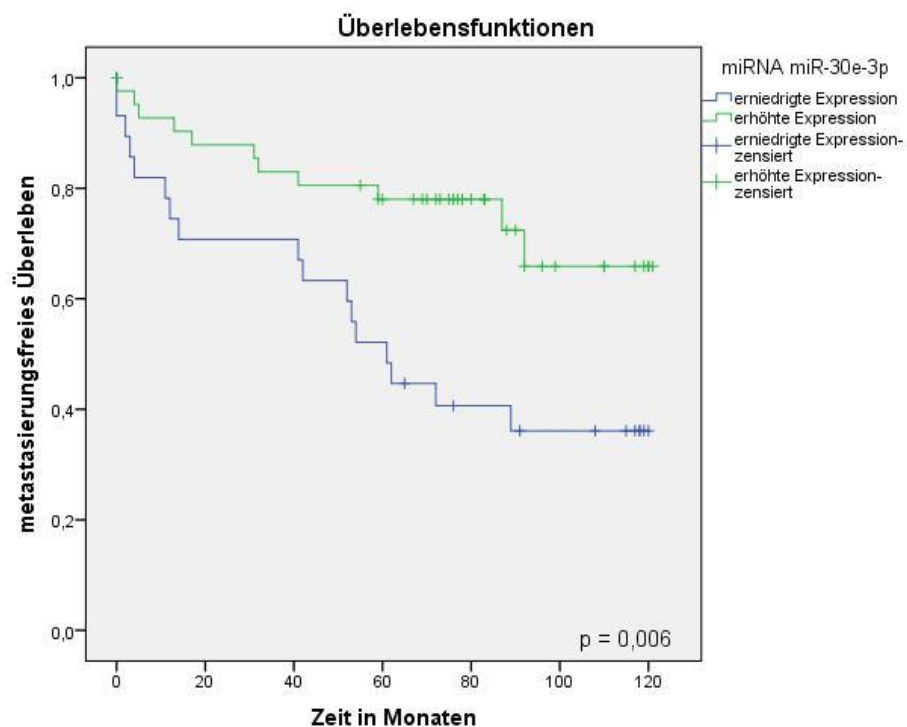


Abbildung 22: Metastasierungsfreie Überlebenszeit der miRNA miR-30e-3p für organbegrenzte Tumoren der TNM-Kategorie T1 und T2. Die Ermittlung der Signifikanz erfolgte durch den log-rank Test.

Tabelle 28: Medianes metastasierungsfreies Überleben in Abhängigkeit von der miR-30e-3p-Expression für organbegrenzte Tumoren.

miRNA-Expression	Median	Standardfehler	95% Konfidenzintervall
erniedrigt	61 Monate	7,749	45,812 – 76,188
erhöht	im Beobachtungszeitraum nicht erreicht	-	-

Die statistische Auswertung mittels Kaplan-Meier-Analysen für die miR-139-5p zeigte ähnliche Ergebnisse. Die miRNA-Expression steht signifikant mit der metastasierungsfreien Überlebenszeit im Zusammenhang (siehe Abbildung 23). Bei einer erniedrigten miRNA-Expression würde das metastasierungsfreie Überleben nach zehn Jahren schätzungsweise bei ca. 39% liegen. Eine erhöhte miRNA-Expression hingegen würde nach zehn Jahren ein metastasierungsfreies Überleben von schätzungsweise 66% zeigen. Das mediane metastasierungsfreie Überleben bei einer erniedrigten Expression der miR-139-5p betrug 62 Monate (siehe Tabelle 29).

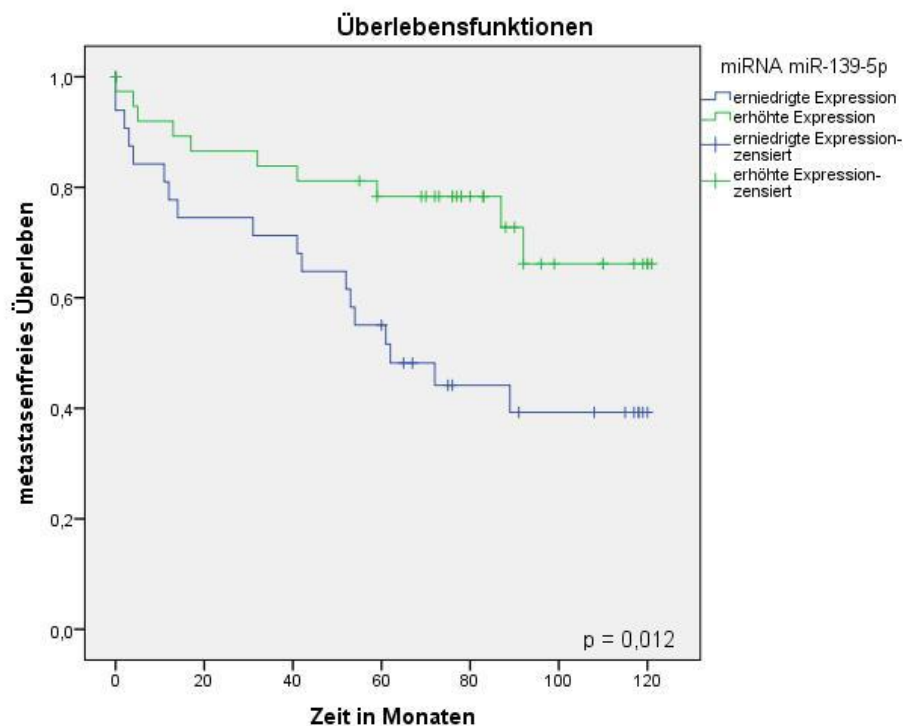


Abbildung 23: Metastasierungsfreie Überlebenszeit der miRNA miR-139-5p für organbegrenzte Tumoren der TNM-Kategorie T1 und T2. Die Ermittlung der Signifikanz erfolgte durch den log-rank Test.

Tabelle 29: Medianes metastasierungsfreies Überleben in Abhängigkeit von der miR-139-5p-Expression für organbegrenzte Tumoren.

miRNA-Expression	Median	Standardfehler	95% Konfidenzintervall
erniedrigt	62 Monate	14,936	32,726 – 91,274
erhöht	im Beobachtungszeitraum nicht erreicht	-	-

5.2.4.2 Korrelation der miRNA-Expression zum Gesamtüberleben bei organbegrenzten Tumoren mittels Kaplan-Meier-Analysen

Um eine Korrelation zwischen dem Gesamtüberleben organbegrenzter Tumoren und der miRNA-Expression zu untersuchen, wurden im nächsten Schritt Kaplan-Meier-Analysen für das Gesamtüberleben bei organbegrenzten Tumoren erstellt. Die Auswertung ergab für die miRNA miR-30e-3p einen signifikanten ($p = 0,045$) Unterschied zwischen der miRNA-Expression und dem Überleben (siehe Abbildung 24). Über zehn Jahre Nachbeobachtung betrug die Gesamtüberlebenszeit bei einer erniedrigten miR-30e-3p-Expression schätzungsweise 41%. Eine erhöhte Expression hingegen ergab eine geschätzte Gesamtüberlebenszeit von 69% innerhalb von 10 Jahren. Die Berechnung der medianen Gesamtüberlebenszeit für die Expression der miR-30e-3p ergab 89 Monate (siehe Tabelle 30).

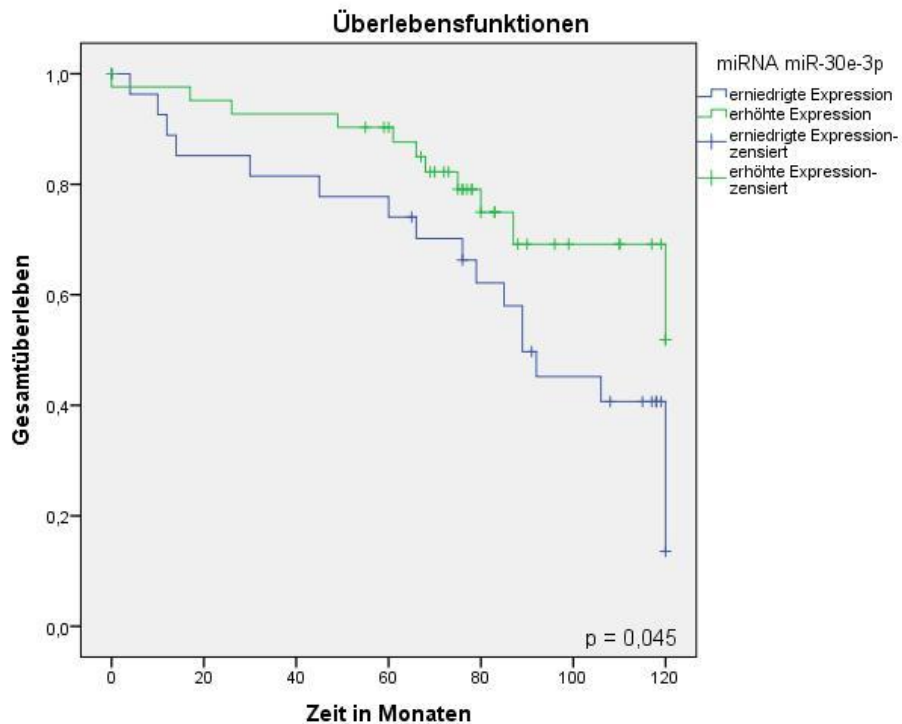


Abbildung 24: Gesamtüberlebenszeit für die unterschiedlichen Expressionslevel der miRNA miR-30e-3p bei organbegrenzten Tumoren. Die Ermittlung der Signifikanz erfolgte durch den log-rank Test.

Tabelle 30: Medianes Gesamtüberleben der unterschiedlichen miRNA miR-30e-3p-Expression für organbegrenzte Tumoren.

miRNA-Expression	Median	Standardfehler	95% Konfidenzintervall
erniedrigt	89 Monate	12,05	65,381-112,619
erhöht	im Beobachtungszeitraum nicht erreicht	-	-

Für die miRNA miR-139-3p wurde ebenfalls ein signifikantes ($p = 0,045$) Ergebnis ermittelt (siehe Abbildung 25). Während bei einer erhöhten miRNA-Expression das geschätzte Gesamtüberleben nach 10 Jahren noch bei 70% lag, wies eine erniedrigte Expression der miRNA miR-139-5p eine geschätzte 10-Jahres-Gesamtüberlebenszeit von 41% auf. Die mediane Gesamtüberlebenszeit für die Expression der miR-139-5p betrug nach Auswertung der Kaplan-Meier-Analysen schätzungsweise 89 Monate (siehe Tabelle 31).

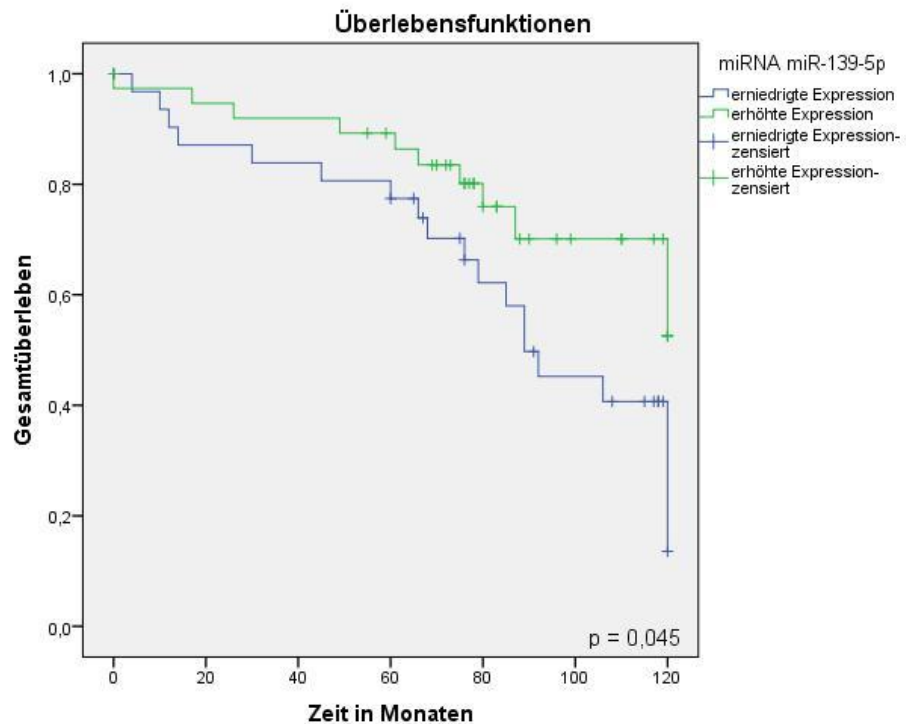


Abbildung 25: Gesamtüberlebenszeit für die unterschiedlichen Expressionslevel der miRNA miR-139-5p bei organbegrenzten Tumoren. Die Ermittlung der Signifikanz erfolgte durch den log-rank Test.

Tabelle 31: Medianes Gesamtüberleben der unterschiedlichen miRNA miR-139-5p-Expression für organbegrenzte Tumoren.

miRNA-Expression	Median	Standardfehler	95% Konfidenzintervall
erniedrigt	89 Monate	11,794	65,883-112,117
erhöht	im Beobachtungszeitraum nicht erreicht	-	-

5.3 Validierung der miRNA Targets auf Proteinebene

5.3.1 Transiente Transfektion

Um die spezifischen miRNA-Targets aus den Vorarbeiten für die miRNA miR-30e-3p zu validieren, wurde die Expression dieser Targets auf Proteinebene *in vitro* mittels Transfektionsstudien überprüft.

Zunächst sollte in Vorversuchen geprüft werden, ob die transiente Transfektion mit den durchgeführten Methoden erfolgreich ist. Der C_T -Mittelwert lag dabei für die Mock-Proben bei 29,960 und für die Mimic-Probe bei 17,339 (siehe Abbildung 26). Der Fold-Change bei einem Vergleich zwischen der Mock-Probe und der Mimic-Probe lag bei diesem ersten Vorversuch bei 3227,398 (siehe Tabelle 32).

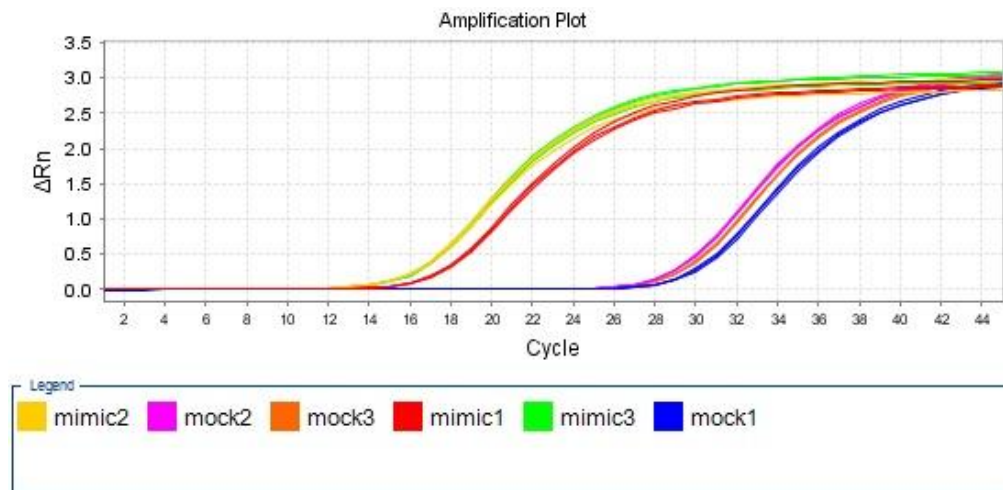


Abbildung 26: Erster Vorversuch zur Überprüfung der transienten Transfektion von miR-30e-3p in der Zelllinie 786-O. C_T -Werte von miR-30e-3p in transfizierten Zellen und Mock-Zellen aus drei Ansätzen dargestellt als Expressionskurve mit jeweils drei technischen Replikaten.

Tabelle 32: Erster Vorversuch mit einer Konzentration von 2 μ l miRNA miR-30e-3p. Fold Change beim Vergleich der Mimic-Probe gegen die Mock-Probe.

Probe	Fold Change
Mimic-Probe gegen Mock-Probe	3227,398

Um für die weiteren Versuche eine ausreichende Konzentration an miRNA in den Zellen zu erreichen, wurden insgesamt drei Vorversuche mit unterschiedlichen Konzentrationen an

miRNA miR-30e-3p durchgeführt (siehe Abbildung 27). Die Ergebnisse über den Vergleich der unterschiedlichen Konzentrationen der miR-30e-3p sind in Tabelle 33 dargestellt.

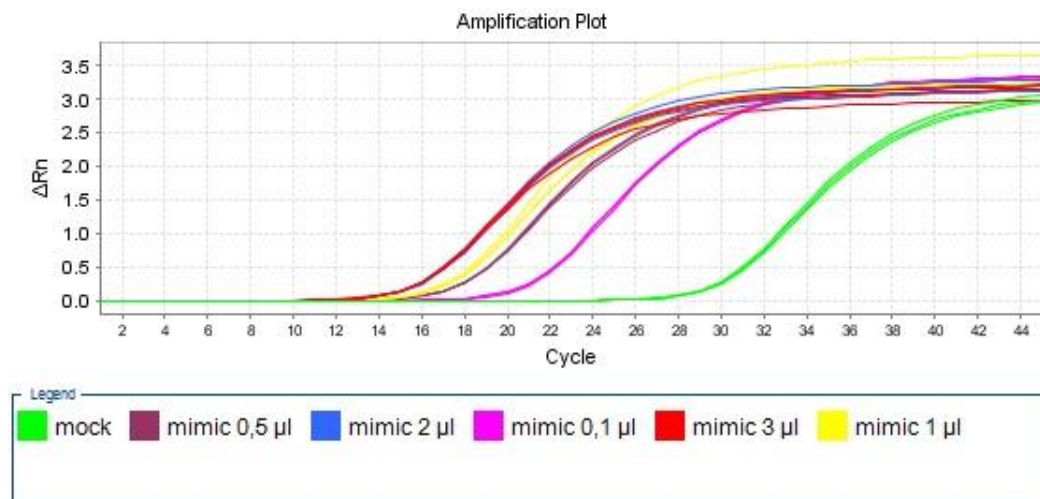


Abbildung 27: Zweiter Vorversuch mit unterschiedlichen Konzentrationen an miRNA miR-30e-3p. Dargestellt sind die Transfektionsansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen an miRNA miR-30e-3p und der Mock-Probe mit jeweils drei technischen Replikaten.

Tabelle 33: Zweiter Vorversuch mit Transfektionsansätzen unterschiedlicher Konzentration von miRNA miR-30e-3p. Der Fold Change ergibt sich hierbei im Vergleich zur Mock-Probe.

Transfektionsansatz	Fold Change
3 µl miRNA miR-30e-3p	6786,685
2 µl miRNA miR-30e-3p	5635,703
1 µl miRNA miR-30e-3p	3027,123
0,5 µl miRNA miR-30e-3p	1790,496
0,1 µl miRNA miR-30e-3p	297,607

Nach Auswertung der Vorversuche wurde entschieden, eine Konzentration von 0,5 µl miRNA miR-30e-3p für die weiteren Transfektionsansätze zu verwenden, da bei dieser Konzentration die Überexpression bestätigt wurde und noch näher an der physiologischen Expression der Zellen lag als die höheren Konzentrationen. Der Transfektionsansatz beinhaltete somit eine Konzentration von 0,5 µl miRNA miR-30e-3p, welche mit 1 µl DharmaFECT und 198,5 µl Opti-MEM® gelöst wurde.

Die erfolgreiche Transfektion mit einer Konzentration von 0,5 µl miRNA miR-30e-3p wurde im dritten Vorversuch mittels qPCR-Analysen überprüft. Hierbei war eine deutliche Überexpression in der Mimic-Probe der miRNA miR-30e-3p in den transfizierten Zelllinien im Vergleich zur Mock-Probe zu verzeichnen (siehe Abbildung 28). Der Fold Change der Mimic-Probe im Vergleich zur Mock-Probe bei einer Konzentration von 0,5 µl miRNA miR-30e-3p lag bei 1914,12 (siehe Tabelle 34).

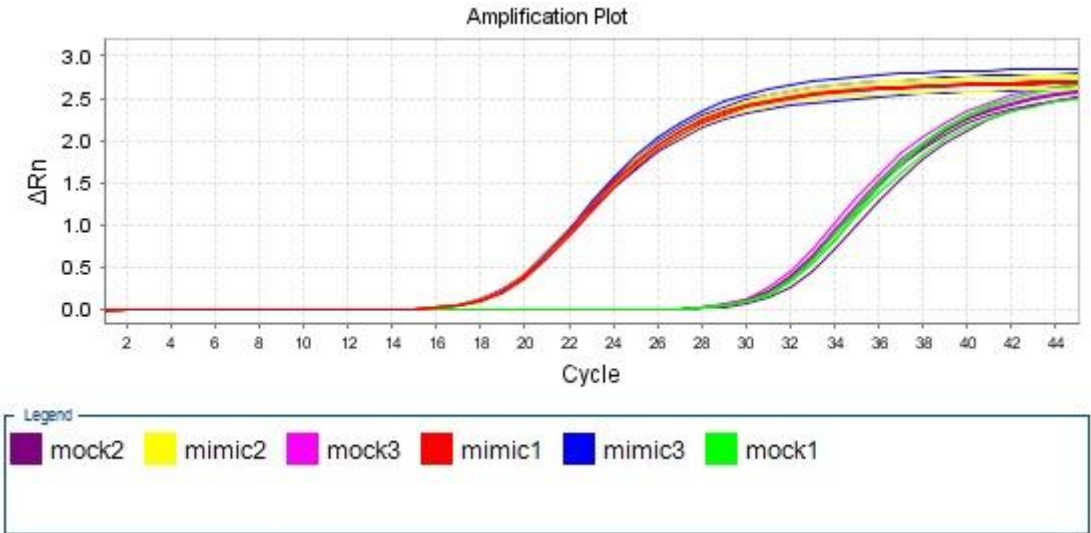


Abbildung 28: Dritter Vorversuch zur Bestätigung der transienten Transfektion mit einer Konzentration von 0,5 µl miRNA miR-30e-3p. Dargestellt sind die drei Transfektionsansätze mit einer Konzentration von 0,5 µl miRNA miR-30e-3p und die Mock-Probe mit jeweils drei technischen Replikaten.

Tabelle 34: Dritter Vorversuch mit einer Konzentration von 0,5 µl miRNA miR-30e-3p. Fold Change beim Vergleich der Mimic-Probe gegen die Mock-Probe.

Probe	Fold Change
Mimic-Probe gegen Mock-Probe	1914,12

5.3.2 Analyse der Proteinkonzentration mittels Western Blot

Im Weiteren wurde überprüft, ob die Transfektion zu einer veränderten Konzentration der Proteine führt. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle 35 dargestellt.

Tabelle 35: Proteinkonzentration nach erfolgter Zellyse.

Probe	mg/ml
Mock p38 + 26	1,28
Mimic p38 + 26	1,20
Mock p38 + 28	1,63
Mimic p38 + 28	1,41
Mock p38 + 30	1,65
Mimic p38 + 30	1,59

Insgesamt wurden bei Durchführung des Western-Blots drei biologische Replikate aufgetragen. Nachfolgend sind die Ergebnisse aus der Analyse der Kandidatenproteine Cofilin sowie NDK aufgeführt (siehe Abbildung 29). Es ergab sich durch die Transfektion in der Auswertung kein signifikanter Unterschied für Cofilin zwischen den Mock- und den Mimic-Proben

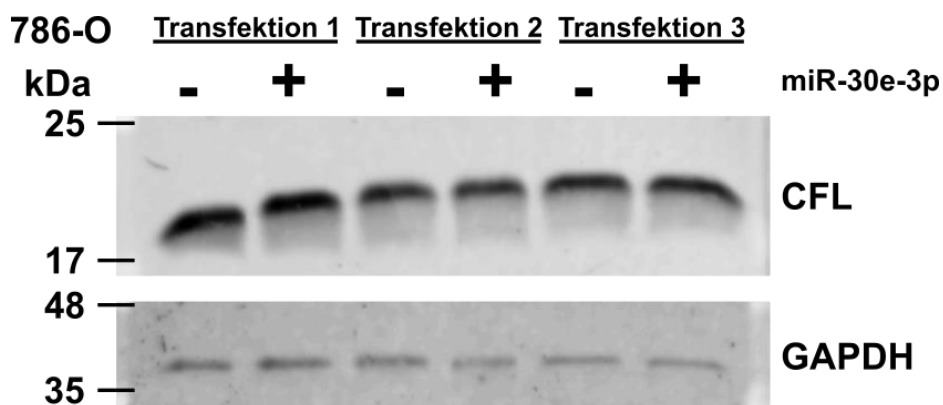


Abbildung 29: Expression der Targets für Cofilin (CFL) für die miRNA miR-30e-3p aus drei verschiedenen Transfektionen. In der Tabelle ist mit „-“ die sogenannte Mock-Probe bezeichnet. Mit einem „+“ sind die Mimic-Proben mit der Transfektion der miRNA miR-30e-3p versehen.

Weiterhin zeigte sich auch für NDK keine signifikant veränderte Konzentration nach der Transfektion (siehe Abbildung 30).

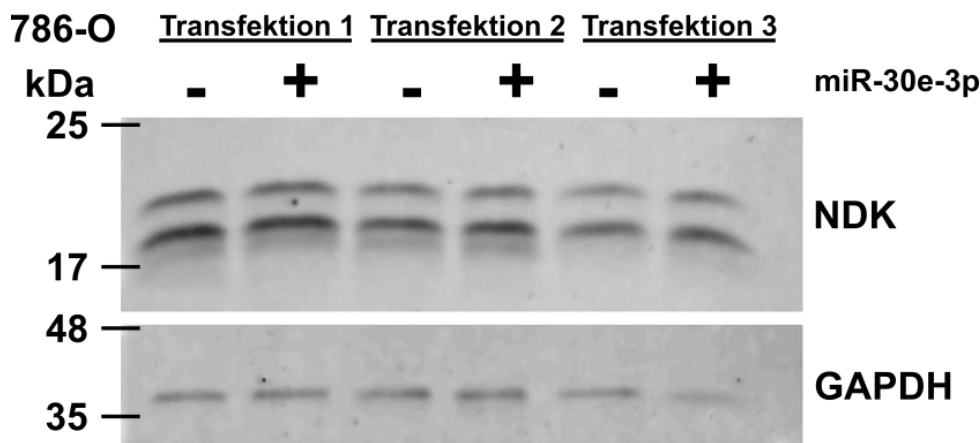


Abbildung 30: Expression der Targets für NDK für die miRNA miR-30e-3p aus drei verschiedenen Transfektionen. In der Tabelle ist mit „-“ die sogenannte Mock-Probe bezeichnet. Mit einem „+“ sind die Mimic-Proben mit der Transfektion der miRNA miR-30e-3p versehen.

In der nachfolgenden Abbildung 31 sind alle untersuchten Kandidaten-Proteine der miRNA miR-30e-3p gemeinsam wiedergegeben.

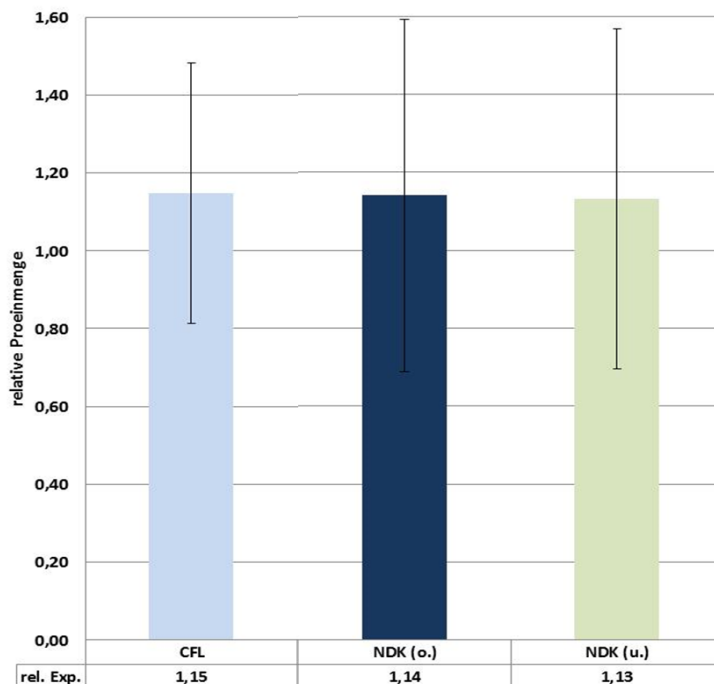


Abbildung 31: Ergebnisse der Proteinkonzentrationsmessung für die Kandidaten-Proteine Cofilin und NDK. Die relative Expression von Cofilin (CFL) lag bei 1,15. Bei NDK zeigen sich nach der Western-Blot-Analyse zwei unterschiedliche Banden. Eine bei ca. 18 kDa (NDK o.) mit einer relativen Expression von 1,14 und eine Bande bei ca. 16 kDa (NDK u.) mit einer relativen Expression von 1,13.

Anschließend wurden die miRNAs der miR-30-Familie (miR-30a/c/e-3p) gemeinsam untersucht (siehe Abbildung 32). Für diese Analyse wurde als Positivkontrolle eine sogenannte *small interfering RNA* (siRNA) gegen Cofilin verwendet. Insgesamt wurden drei Reaktionsansätze durchgeführt. Im ersten Ansatz wurde der Zelllinie 786-O weder siRNA, noch miRNA transfiziert. Bei der sogenannten Mock-Probe wurde keine Veränderung in der Proteinkonzentration festgestellt. Im zweiten Ansatz mit siRNA zeigte sich eine verminderte Proteinkonzentration. Im dritten Ansatz konnte durch die Transfektion der miRNAs-30a/c/e-3p eine signifikante Herunterregulation in der Proteinkonzentration von Cofilin ($p = 0,04$) im Vergleich zur Mock-Probe beobachtet werden.

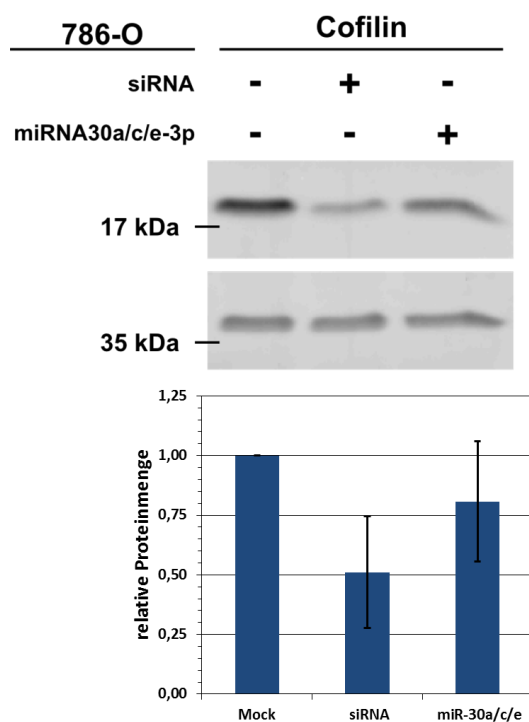


Abbildung 32: Relative Proteinmenge im Vergleich zwischen der Leerprobe (Mock), der Kontrollprobe (siRNA) und der mit miRNA-30-Familie transfizierten Probe (Mimic).

6 Diskussion

Das kNZK ist mit 80-90% der häufigste Tumor der Niere und weist eine hohe Mortalitätsrate auf (Staderini et al. 2015). Insgesamt weist das kNZK eine 5-Jahres-Überlebensrate von 71% auf (Llungberg et al. 2017). Die Prognose hängt insbesondere von der Metastasierung ab. Bei einem bereits metastasierten NZK beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate lediglich ca. 10% (Heng et al. 2013). Die Möglichkeit einer genauen Bestimmung des individuellen Metastasierungsrisikos kann zu einer besseren Einteilung in Prognosegruppen verhelfen. Die Prognosebewertung ist insbesondere für eine individuelle Nachsorge- und Therapieplanung essentiell, um die Patienten mit aggressiven Tumoren für adjuvante Studien bzw. für eine intensivere Nachsorge zu selektieren.

Zur Vorhersage des Metastasierungspotentials konnten in den letzten Jahren miRNAs als potentielle biologische Marker identifiziert werden. Einige Studien belegen bereits, dass miRNAs bei verschiedenen Tumorarten eine wesentliche Rolle als Regulatoren der Tumorentwicklung und –progression spielen (Calin and Croce 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass einzelne miRNAs zur Bewertung des Metastasierungsrisikos im kNZK als prognostische Marker dienen können (Khella et al. 2015).

6.1 Validierung der prognostischen Relevanz der miR-30e-3p und miR-139-5p

In den vorangegangenen Microarray-Analysen unserer Arbeitsgruppe konnten 14 miRNAs identifiziert werden, welche signifikante Expressionsunterschiede zwischen metastasierten und nichtmetastasierten Primärtumoren im kNZK aufwiesen. Dabei zeigten die miR-204, miR-30c, miR-30a und miR-30e-3p die stärksten Expressionsunterschiede in metastasierten Primärtumoren und Fernmetastasen im Vergleich zu nichtmetastasierten Primärtumoren. Ziel dieser Arbeit war es, die Aussagekraft der miR-30e-3p bezüglich des Metastasierungsrisikos in einer unabhängigen Kohorte zu validieren.

Bei der Validierung der miR-30e-3p im kNZK zeigten die Ergebnisse höchst signifikante Expressionsunterschiede zwischen den metastasierten und nichtmetastasierten Primärtumoren. Dabei wiesen die metastasierten Tumore für die miR-30e-3p eine höchst signifikant verringerte Expression im Vergleich zu nichtmetastasierten Tumoren auf. Somit konnten die Ergebnisse der Microarray-Analysen für die miRNA miR-30e-3p an einer unabhängigen Kohorte bestätigt werden. Aufgrund der ermittelten Sensitivität von 75% als auch der Spezifität von 61% ist die miR-30e-3p allein betrachtet nicht in der Lage das Metastasierungsrisiko zu 100% vorauszusagen. Allerdings kann die miR-30e-3p als potentieller Marker gemeinsam

mit anderen miRNAs zur Einschätzung des Metastasierungsrisikos herangezogen werden. Die vorliegenden Ergebnisse werden auch durch die Daten von Mlcochova et al. belegt. Sie bestätigen in Ihren Untersuchungen eine signifikant verringerte Expressionsrate der miR-30e-3p in metastasierten Tumoren im Vergleich zu nichtmetastasierten Tumoren (Mlcochova et al. 2016).

Eine verringerte Expression der miR-30e-3p in Tumorgewebe konnte auch für andere Tumor-entitäten nachgewiesen werden. Beispielsweise ist die Expression der miR-30e-3p in metastasierenden Melanomzelllinien im Vergleich zu primären Tumorzelllinien herunterreguliert (Mueller, Rehli, and Bosserhoff 2009). Auch im kolorektalen Karzinom konnte die untersuchte miRNA in Bezug auf die Beta-Catenin/*T-cell factor 4* (β -Catenin/TCF)-Aktivität identifiziert werden. Dabei wies die miR-30e-3p in den Zellen des primären kolorektalen Karzinoms im Vergleich zu den Zellen der normalen benachbarten Schleimhaut ebenfalls eine erniedrigte Expression auf (Schepeler et al. 2012). Eine Studie von Silva et al. untersuchte in Plasmavesikeln von nicht-kleinzelligen Lungentumoren (*Non Small Cell Lung Cancer* - NSCLC) das Expressionsprofil verschiedener miRNAs. Dabei zeigten sich in den Plasmavesikeln der NSCLC-Patienten erniedrigte Werte der miR-30e-3p (Silva et al. 2011). Zusätzlich wird in weiteren Studien eine erhöhte Expression der miR-30e-3p im Tumorgewebe nachgewiesen. Beispielsweise untersuchten Lee et al. die Expression von vier miRNAs (miR-30c, miR-30d, miR-30e-3p, miR-370) im Ovarialzellkarzinom. Dabei zeigte sich für die miR-30e-3p eine höhere Expression in den Ovarialkarzinomen im Vergleich zum Normalgewebe (Lee et al. 2012). Diese Ergebnisse weisen auf die Gewebe- und Tumorspezifität der miRNAs hin.

Die vorangegangenen Microarray-Analysen ergaben auch für die miR-139-5p und miR-144-5p eine deutliche Überexpression in nichtmetastasierten Tumoren im Vergleich zu den metastasierten Tumoren. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen auch für die miR-139-5p eine höchst signifikant verringerte Expression in metastasierten im Vergleich zu nichtmetastasierten Tumoren. Die hierbei ermittelte Sensitivität von 71% und die Spezifität von 63% zeigen, dass auch die miR-139-5p einzeln betrachtet das Metastasierungsrisiko nicht 100%ig voraussagen kann. Um als potentieller Biomarker zur Vorhersage des Metastasierungspotentials dienen zu können, sollte die miR-139-5p deshalb im Zusammenhang mit weiteren miRNAs geprüft werden.

Bei Betrachtung der aktuellen Studienlage in Bezug auf das kNZK wurde ebenfalls eine Herunterregulation der miR-139-5p im Vergleich zu normalem Gewebe beschrieben (Butz et al. 2014). In einer weiteren Studie von Shu et al. konnten zwei der acht untersuchten miRNAs signifikant mit einem kNZK-Rezidiv assoziiert werden. Dabei korrelierten niedrige Expressionswerte der miRNAs miR-204-5p und miR-139-5p mit einem signifikant erhöhten Risiko im

Verlauf ein kNZK-Rezidiv zu entwickeln (Shu et al. 2017). Frühere Studien haben auch über die tumorunterdrückende Funktion von miR-139-5p bei Tumorrezidiven oder Metastasen berichtet. In der Studie von Slaby et al. wurde eine verminderte Expression der miR-139-5p in Geweben von kNZK-Patienten mit Rezidiven nach Nephrektomie verbunden (Slaby Ondrej et al. 2012). Für die miR-139-5p konnte zudem im kNZK eine Herunterregulation im Vergleich zwischen Normalgewebe und metastasierten kNZK nachgewiesen werden (Wu et al. 2012).

Auch für verschiedene weitere Tumorentitäten wurde über eine Herunterregulation der miR-139-5p-Expression berichtet. Song et al. stellten fest, dass die miR-139-5p signifikant in 73,8% der Karzinomproben des kolorektalen Karzinoms im Vergleich zum benachbarten Normalgewebe herunterreguliert war (Song et al. 2014). Vergleichbare Ergebnisse wurden in einer weiteren Studie ebenfalls mittels Microarray-Analysen erzielt. Dabei konnten 25 miRNAs identifiziert werden, die in Zellen des hepatozellulären Karzinoms dereguliert sind. Unter diesen 25 miRNAs wurde eine Herunterregulation der miR-139-5p beobachtet (Zhengqiang Wang et al. 2016). Auch im Mammakarzinom ist die miRNA-Expression in den aggressiveren Subtypen häufig herunterreguliert (Krishnan et al. 2013). Zusätzlich wird bei einer Progression von primärem zu metastasierendem laryngealen Plattenepithelkarzinom über eine reduzierte Expression der miR-139-5p berichtet (Luo et al. 2014). Ebenfalls wird ein hohes Risiko für ein Plattenepithelkarzinom des Oesophagus für Patienten mit einer Herunterregulation der miR-139-5p-Expression verbunden (Liu et al. 2013). Eine weitere Studie von Yoshino et al. hat im Blasenkarzinom 17 herunterregulierte miRNAs identifiziert. Unter diesen miRNAs wurde auch für die miR-139-5p eine erniedrigte Expression beschrieben (Yoshino et al. 2011). Ebenso wurde auch für die miR-139-5p eine Herunterregulation der Expression im Ovarialkarzinom beschrieben (Miles et al. 2012). Auch für das Basalzellkarzinom konnten von Sand et al. insgesamt 10 herunterregulierte miRNAs im Vergleich zu gesunder Haut identifiziert werden. Unter diesen 10 deregulierten miRNAs befand sich auch die miR-139-5p (Sand et al. 2012).

Insgesamt bestätigen die vorliegenden Ergebnisse sowie die aktuelle Studienlage zu den beiden untersuchten miRNAs miR-30e-3p und die miR-139-5p deren mögliche Funktion als potentielle biologische Marker und sollten in Modelle zur Vorhersage des Metastasierungspotentials einbezogen werden.

6.2 Korrelation der miRNA-Expression zum metastasierungsfreien Überleben und Gesamtüberleben

Als weiteres Ziel dieser Arbeit sollte die Korrelation zwischen den beiden miRNAs (miR-30e-3p, miR-139-5p) und dem metastasierungsfreien Überleben überprüft werden. In der vorliegenden Arbeit unterstützen die ausgewerteten Ergebnisse die Hypothese, dass das Metastasierungsrisiko des kNZKs mit dem Expressionslevel spezifischer miRNAs assoziiert ist. Die Auswertung der klinischen Verlaufsdaten zeigte sowohl für die miR-30e-3p als auch für die miR-139-5p, dass eine verminderte miRNA-Expression mit einer signifikant verkürzten metastasierungsfreien Zeit in Verbindung gebracht werden kann.

Diese Korrelation ist ebenfalls für verschiedene andere Tumorentitäten beschrieben worden. Beispielsweise konnte beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom ein statistisch signifikanter Unterschied im metastasierungsfreien Überleben in Bezug auf die Plasmaspiegel der miR-30e-3p beobachtet werden. Die Patienten mit niedrigen Expressionswerten der miR-30e-3p hatten eine 50-monatige metastasierungsfreie Überlebensrate von lediglich 13%. In der Gruppe mit hohen Expressionswerten der miR-30e-3p zeigte sich hingegen eine 50-monatige metastasierungsfreie Überlebensrate von 50% (Silva et al. 2011). In einer Studie von Lee et al. zur Untersuchung der miRNA-Expression bei Patienten mit Ovarialkarzinom zeigte sich im Vergleich zu gutartigen Ovarialtumoren und Borderline-Tumoren, dass eine höhere Expression der miR-30e-3p ein unabhängiger prognostischer Marker für ein progressionsfreies Überleben ist. Bei Auswertung der Analysen entsprach eine höhere Expression von miR-181d, miR-30c, miR-30d und miR-30e-3p einem signifikant längeren progressionsfreien Überleben. Nach 59 Monaten Nachbeobachtungszeit betrug die progressionsfreie Überlebensrate der Patienten mit Resektion des Tumors 33%. Dabei hatten die Patienten mit einer niedrigen miR-30e-3p-Expression nach 50 Monaten Nachbeobachtungszeit eine Überlebensrate von 13% und die Gruppe mit hohen Expressionswerten eine Überlebensrate von 50% (Lee et al. 2012).

In Hinblick auf die Prognose der Patienten wurde nicht nur die Frage nach einer Korrelation in Bezug auf die Metastasierung verfolgt, sondern auch, ob eine Korrelation zwischen der miRNA-Expression und dem Gesamtüberleben der Patienten besteht. Für die beiden untersuchten miRNAs miR-30e-3p und miR-139-5p konnte jedoch kein signifikantes Ergebnis ermittelt werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Gesamtüberleben nicht allein von der Metastasierung abhängig ist. Auch der Therapiezeitpunkt, die Therapieform, die Therapieverträglichkeit, die Therapieresistenz und diverse zusätzliche Bedingungen nehmen Einfluss auf das Gesamtüberleben. Hinzu kommt, dass in der ausgewählten Kohor-

te zu wenige Todesereignisse vorliegen, um statistisch sichere Aussagen erbringen zu können. Somit ist ein Vergleich im Hinblick auf das Gesamtüberleben nur eingeschränkt möglich. Zukünftig sollte das tumorspezifische Überleben betrachtet werden. In dieser Studie waren hierzu keine ausreichenden Daten verfügbar.

In einigen Studien konnte für die beiden untersuchten miRNAs bereits eine Korrelation zwischen der Expression und dem Überleben von Patienten mit anderen Tumorentitäten eruiert werden. In einer Studie von Zhengqiang et al. konnten 25 miRNAs identifiziert werden, die in Zellen des hepatozellulären Karzinoms dereguliert sind. Eine erniedrigte Expression der miR-139-5p im Tumorgewebe wies auf eine schlechte Prognose in Bezug auf das Gesamtüberleben hin (Zhengqiang Wang et al. 2016). Zudem wurde die erniedrigte Expression der miR-139-5p im kolorektalen Karzinom mit einer schlechten Prognose assoziiert. Hierbei zeigte sich eine Korrelation zwischen der Expression der miR-139-5p mit dem Gesamtüberleben (Song et al. 2014). Eine weitere Studie belegte, dass Veränderungen der miRNA-Expressionsstufen mit der Prognose bei endometrialen serösen Adenokarzinomen in Zusammenhang stehen. Die Analyse ergab, dass eine geringere Expression von der miRNAs miR-101, miR-10b, miR-139-5p, miR-152, miR-29b und miR-455-5p signifikant mit einem schlechten Gesamtüberleben korreliert (Hiroki et al. 2010). In einer Studie von Zaman et al. korrelierte das 5-Jahres-Überleben mit dem Expressionsniveau der miR-21. Dabei überlebten die Patienten mit einer erniedrigten miR-21-Expression alle die 5 Jahre nach der Operation während die Patienten mit einer erhöhten miR-21-Expression lediglich eine Überlebensrate von 50% aufwiesen (Zaman et al. 2012).

In einer weiteren Studie von Li et al. konnte ebenfalls eine Herunterregulation der miRNA miR-217 im kNZK im Vergleich zu Normalgewebe nachgewiesen werden. Dabei überlebten alle Patienten mit einer hohen miR-217-Expression fünf Jahre, während bei einer erniedrigten Expression nur 40% der Patienten überlebten (Li et al. 2013). Eine andere Studie zeigte, dass das Verhältnis zwischen der miR-21 und der miR-10b mit dem Überleben und dem TNM-Stadium im kNZK korreliert. Es zeigte sich bei diesem Verhältnis sogar eine bessere Vorhersagekraft als bei der Betrachtung einer singulären miRNA. Somit könnte das Verhältnis zwischen der miR-21 und der miR-10b ein unabhängiger prognostischer Faktor für metastasierungsfreie Patienten im kNZK sein. Dieses Verhältnis könnte genutzt werden, um Hochrisikopatienten zu identifizieren, die von einer intensiveren Therapie und Überwachung profitieren könnten (Fritz et al. 2014). Zudem wurde eine Korrelation in Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben bei Patienten mit geringerer miRNA-Expression der miRNAs miR-23b und miR-27b beobachtet (Ishihara et al. 2014). In einer weiteren Studie konnte bei Patienten nach Nephrektomie eine 17,5-fache Erhöhung der miRNA miR-125b-Expression festgestellt werden. Die Expression der miR-125b konnte zudem mit einem höheren Fuhrman-Grad und

einem fortgeschrittenen TNM-Stadium in Korrelation gebracht werden. Somit hat sich die miR-125b als ein unabhängiger prognostischer Faktor im kNZK erwiesen. Darüber hinaus verbesserte die Kombination der miRNA miR-125b-Expression mit dem TNM-Stadium die Prognosegenauigkeit des kNZK (Fu et al. 2014).

6.3 Metastasierungsrisiko bei organbegrenzten Tumoren

Im Weiteren konnte in dieser Arbeit ein Bezug zum Metastasierungsrisiko bei organbegrenzten Tumoren hergestellt werden. Die organbegrenzten Tumore stellen die Gruppe der TNM-Kategorien pT1 und pT2 dar, die eine bessere Prognose aufweisen. Patienten mit kNZK der TNM-Kategorie pT1 oder pT2 haben in der Regel eine 5-Jahres-Überlebensrate von 95% und 88% und entwickeln seltener Metastasen als Patienten mit Erkrankungen im Spätstadium (Wu et al. 2012). Jedoch bleibt zu bedenken, dass trotz der Einteilung in gute prognostische Gruppen eine Metastasierung auch in der TNM-Kategorie T1 und T2 auftreten kann. Deshalb ist eine Berücksichtigung der T-Kategorie nicht ausreichend und unterstreicht die Notwendigkeit, molekulare Marker zu identifizieren, welche in der Lage sind das metastatische Potential zu definieren. Anhand einer spezifischen miRNA-Expression könnten somit die aggressiven Tumore mit einer vermeintlich guten Prognose frühzeitig identifiziert werden und den Patienten rechtzeitig eine entsprechende Therapie und Nachsorge angeboten werden. Die Ergebnisse zeigten hier sowohl für die miR-30e-3p als auch für die miR-139-5p signifikante Ergebnisse. Bei einer erniedrigten miRNA-Expression der miR-139-5p wiesen nach zehn Jahren Nachbeobachtungszeit schätzungsweise 39% der Patienten keine Metastasierung auf. Vergleichbare Ergebnisse zeigte eine erniedrigte Expression der miRNA miR-30e-3p. Hier waren lediglich ca. 36% der Patienten noch nach zehn Jahren metastasierungsfrei. Somit konnte eine Korrelation zwischen der miRNA-Expression und dem metastasierungsfreien Überleben auch bei organbegrenzten Tumoren hergestellt werden. Demnach könnte eine frühzeitige Analyse der miRNA-Expressionsmuster dazu beitragen, die aggressiven Tumore zu einem frühen Zeitpunkt zu identifizieren und zu behandeln. Zudem konnte in Bezug auf das Gesamtüberleben bei organbegrenzten Tumoren eine Korrelation zu einer unterschiedlichen miRNA-Expression nachgewiesen werden. Dies unterstreicht den Nutzen der miRNAs als potentielle molekulare Marker zur Vorhersage des Metastasierungspotentials auch schon in niedrigen T-Kategorien.

Um eine Risikoklassifizierung der Patienten mit metastasiertem NZK vor einer Systemtherapie vernehmen zu können, stehen Risikomodelle wie das *Cleveland Clinic Foundation-Modell* (CCF), das French Modell, das Sunitinib-Modell und der Leibovich-Score zur Verfügung (Leitlinienprogramm Onkologie - S3 Leitlinie Nierenzellkarzinom 2017). Der Leibovich-

Score nimmt eine Einteilung der Patienten anhand klinischer-pathologischer Merkmale wie der T-Kategorie, dem Fuhrman-Grad, der Tumornekrose, dem Tumordurchmesser und dem Lymphknotenstatus vor. Die Patienten werden in eine niedrige, mittlere und hohe Risikogruppe bzgl. des postoperativen Metastasierungsrisikos eingeteilt (Leibovich et al. 2010). Eine Validierung des Leibovich-Scores durch Pichler et al. führte zu einer Genauigkeit (C-Index) von 0,79 (Pichler et al. 2013). Somit sind derzeit etablierte Prognosescores wie der Leibovich-Score zur Vorhersage des Metastasierungsrisikos aufgrund ihrer eingeschränkten Aussagegenauigkeit limitiert. Deshalb sollten zukünftig eine personalisierte Einstufung des Metastasierungsrisikos anhand biologischer Merkmale, auch in Form einer miRNA-Signatur vorgenommen werden, um somit die Patienten zielgerichteter adjuvant behandeln zu können und einen Vorteil für das Gesamtüberleben zu erbringen. Es könnte sich dadurch ein Vorteil der adjuvanten Therapie in den tatsächlichen Hochrisikogruppen zeigen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit zuverlässiger molekularer Marker, um das Metastasierungsrisiko beim kNZK ausreichend bewerten zu können. Damit könnten Patienten mit aggressiven kNZK für weitere adjuvante klinische Studien oder zumindest für eine intensivere Nachsorge selektiert werden.

Für die Auswahl der adjuvanten Therapie werden die Patienten bislang - wie bereits oben für den Leibovich-Score beschrieben - anhand von Prognoseparametern basierend auf klinischen Merkmalen wie Tumorgöße, T-Kategorie, Nukleargrad, Nodalstatus und Tumornekrose eingestuft. Nach den aktuellen Empfehlungen in der Leitlinie wird die adjuvante Therapie nicht empfohlen (Ljungberg et al. 2015). Zuletzt veröffentlichte klinische Studien zeigen momentan noch keinen Gesamtüberlebensvorteil bei einer adjuvanten Behandlung mit Sunitinib, Sorafenib oder Pazopanib, da die Patientenselektion bzw. die Einteilung in geeignete Risikogruppen hierfür möglicherweise noch nicht zufriedenstellend ist.

Eine dieser Studien ist die randomisierte prospektive Studie bezüglich der unterschiedlichen Therapieansätze beim metastasierten NZK von Haas et al.. Dabei zeigten die letzten adjuvanten Therapien bei Patienten, die eine Therapie mit den Tyrosinkinase-Inhibitoren Sunitinib oder Sorafenib erhielten, keinen Gesamtüberlebensvorteil gegenüber Placebo. Darüber hinaus kam es trotz Dosisreduktionen bei einem großen Teil der Patienten zu einem Behandlungsabbruch aufgrund von toxischen Reaktionen. Diese Ergebnisse liefern ein starkes Argument gegen den Einsatz dieser Medikamente bei aggressiven Nierentumoren in der adjuvanten Einstellung (Haas et al. 2016). Auch die kürzlich durchgeführte PROTECT Studie untersuchte die Wirksamkeit von Pazopanib gegenüber Placebo bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem NZK nach Nephrektomie und zeigte ebenfalls keinen Gesamtüberlebensvorteil der Patienten (Motzer et al. 2017). In der randomisierten S-TRAC-Studie von Ravaud et al. wurde bei Hochrisikopatienten eine adjuvante Behandlung mit Sunitinib und Placebo

durchgeführt. Auch hier zeigten die Ergebnisse keine Auswirkungen auf das Gesamtüberleben der Patienten (Ravaud et al. 2016).

Zusammenfassend könnte die Vorhersage des pathologischen Grades oder Stadiums anhand einer miRNA-Expression die Erstellung und Umsetzung eines individualisierten Behandlungsplans erleichtern und den Patienten somit individuellere Therapiestrategien und Nachsorgepläne ermöglicht werden.

6.4 Funktionelle Bedeutung der Targets für die miRNA miR-30e-3p auf Proteinebene

Bei der Tumorgenese stehen vor allem das unkontrollierte Zellwachstum, die Migration, die Invasion und die Metastasierung im Vordergrund. Trotz der Fortschritte in der Tumorthherapie gibt es nach wie vor Einschränkungen bei der Behandlung des kNZK. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass die beiden miRNAs miR-30e-3p und miR-139-5p mit der Metastasierung assoziiert sind. Daher kann die Identifizierung der Funktion dieser beiden miRNAs und ihrer Targets Aufschluss über ihre Bedeutung bei dem komplexen Prozess der Metastasierung geben. Hierfür wurden in Vorarbeiten potentielle miRNA-Targets in Zellkulturmodellen der Zelllinie 786-O auf Proteinebene identifiziert. Ziel dieser Arbeit war es, diese spezifischen miRNA-Targets zu validieren.

Dass den beiden miRNAs eine bedeutende Rolle in der Tumorgenese verschiedener Tumor-entitäten zukommt, wurde bereits in zahlreichen Studien belegt. So sind diese beiden miRNAs beispielsweise in der Lage, das Wachstum von kolorektalen Zellen *in vitro* zu hemmen, wenn sie ektopisch exprimiert werden (Schepeler et al. 2012). Schepeler et al. konnten zudem zahlreiche mRNAs und Proteine identifizieren, die mit der miR-30e-3p-Expression in Zusammenhang stehen.

Ein weiterer Prozess, welcher Einfluss in der metastatischen Kaskade nimmt, ist die Hemmung der miR-139-3p-Expression beim Magenkarzinom. Diese Hemmung erfolgt durch eine Interaktion von *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) mit *Cluster of differentiation 44* (CD44). Durch epigenetisches silencing wird die miRNA-Expression gehemmt. Dadurch kommt es zur Regulation des Chemokinrezeptors 4 (CXCR4), welcher wiederum Einfluss auf die Metastasierung nimmt (Bao et al. 2011; Sun et al. 2010). Auch im laryngealen Plattenepithelkarzinom reguliert die miR-139-5p die CXCR4-Expression und fördert somit die Tumorgenese (Huang et al. 2017).

In Bezug auf das kNZK wurden die beiden untersuchten miRNAs bereits mit verschiedenen Metastasierungsprozessen in Verbindung gebracht. Die miRNAs spielen hier eine wichtige Rolle in der metastatischen Kaskade. Zu dieser Kaskade zählt auch die epitheliale-

mesenchymale Transition (EMT). EMT bezeichnet eine Änderung der morphologischen Zelleigenschaften, wobei diese Zellen ihre epithelialen Eigenschaften verlieren und einen mesenchymalen Phänotyp annehmen. Die Tumorzellen, welche eine EMT durchlaufen haben, besitzen ein höheres Metastasierungspotential. Eine der bedeutendsten deregulierten EMT-assoziierten miRNAs sind die miRNAs der miR-200-Familie. Aber auch die miR-30e-3p aus der miR-30-Familie wird im Zusammenhang mit der EMT erwähnt (Mlcochova et al. 2016). Im kolorektalen Karzinom konnte die miR-139-5p signifikant mit dem Metastasierungspotenzial und der Medikamentenresistenz assoziiert werden, indem sie Einfluss auf die EMT nimmt. In diesem Zusammenhang konnte BCL2 als direktes Target der miR-139-5p *in vitro* identifiziert werden. Zudem konnte die miR-139-5p eindeutig mit dem BCL2-Signalweg in Zusammenhang gebracht werden. Diese Erkenntnis gibt Aufschluss über den Mechanismus der miRNA-Regulation von kolorektalen Metastasen und stellt möglicherweise ein neuartiges therapeutisches Ziel für die Therapie des kolorektalen Karzinom dar (Li et al. 2016).

Die funktionelle Rolle der miRNAs im kNZK wurde jedoch bisher nur in vereinzelten Studien untersucht. Deshalb war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die bereits identifizierten miRNA-Targets der miR-30e-3p zu validieren. Für diese funktionellen Analysen konzentrierte die Arbeit sich auf die miR-30e-3p, welche in metastasierten Tumoren des kNZK eine signifikant verminderte Expression aufwies und somit einen potentiellen klinischen Wert besitzt. In Vorarbeiten wurden mögliche Targets der Zelllinie 786-O auf Proteinebene identifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurden diese potentiellen Targets *in vitro* mittels Transfektionsstudien und Western Blot-Analysen validiert. Zusammenfassend zeigte sich, dass bei einer Erhöhung der miRNA miR-30e-3p keine verminderte Proteinkonzentration der untersuchten Targets vorlag. Sowohl bei Cofilin als auch bei NDK war keine verminderte Proteinkonzentration messbar.

Die Vorarbeiten für diese Arbeit belegen, dass verschiedene Mitglieder der miR-30-Familie in den metastasierten Zellen des kNZK herunterreguliert sind. Darunter zählen die miRNAs miR-30a-3p, miR-30c-2-3p sowie die miR-30e-3p. Diese miRNAs weisen alle eine sehr ähnliche Nukleotidsequenz auf (Guess et al. 2015). Es lässt sich vermuten, dass eine Überexpression einer dieser miRNAs der miR-30-Familie nicht ausreicht, um das Zieltarget herunterzuregulieren. Daher wurde eine kombinierte miRNA-Transfektion der gesamten miR-30-Familie vorgenommen und die Validierung der potentiellen Targets auf die gesamte miR-30-Familie erweitert. Dabei konnte Cofilin als mögliches Target bestätigt werden. Cofiline sind evolutionär konservierte Proteine, die in allen eukaryontischen Zellen vorhanden sind. Ihre Hauptfunktion besteht in der dynamischen Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. Es wird dabei zwischen zwei Isoformen unterschieden: Cofilin-1 kommt in allen nicht-Muskelzellen und in embryonalen Muskelzellen vor. In reifen Skelett- und Herzmuskeln dominiert jedoch

das Cofilin-2 (Ostrowska and Moraczewska 2017). Cofilin-1 ist essentiell für das Fortschreiten des Zellzyklus, die Migration, die Intravasation und die Invasion von Krebszellen (Wang et al. 2006). Im Hinblick auf die Regulierung durch miRNAs wurde belegt, dass sowohl die miRNA let-7b als auch die miRNA let-7e durch eine langfristige Überexpression von Cofilin-1 hochreguliert wurden. Somit könnte eine Überexpression von Cofilin-1 die Tumورprogression durch die Erhöhung der miRNA let-7 beeinflussen. Dies könnte einen neuartigen Signalweg zwischen Cofilin und let-7 liefern, welcher Einfluss auf die Tumorentstehung nimmt (Tsai et al. 2015). Zudem konnten bereits für einige weitere miRNAs die Signalwege und Targets identifiziert werden.

In der Studie von Wang et al. konnte nachgewiesen werden, dass in der Zelllinie 786-O nach Überexpression von miR-30e-3p die Invasion und Migration von Zellen nachweislich gehemmt wurde. In diesem Zusammenhang stellten Wang et al. fest, dass Snail1 ein potentielles Zielgen der miR-30e-3p darstellt. Snail1 ist ein zinkfingerhaltiger Transkriptionsfaktor, der ursprünglich in *Drosophila* identifiziert wurde. Die Ergebnisse liefern den Beweis, dass das Expressionsniveau von Snail1 negativ mit der miR-30e-3p-Expression in Geweben und Zelllinien des kNZKs korreliert. Darüber hinaus zeigte sich, dass Snail1 direkt von miR-30e-3p reguliert wird. Daher deuten die Ergebnisse darauf hin, dass miR-30e-3p seine Funktionen durch direktes Targeting von Snail1 ausübt, sodass ein neuer therapeutischer Ansatz für die Therapie des kNZK möglich sein könnte (Wang et al. 2017).

Die genannten Studien und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Bedeutung der miRNAs in unterschiedlichen Prozessen der Tumorentstehung und –ausbreitung. Folglich kann die Identifizierung der Targets dazu beitragen, neue Informationen über die Tumorphathologie zu erhalten und somit neue Therapieansätze schaffen. Jedoch sind die molekularen Mechanismen, die der Migration und Invasion zugrunde liegen, bisher nur teilweise verstanden und bedürfen zusätzlicher Untersuchungen.

7 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten die beiden miRNAs miR-30e-3p und miR-139-5p erfolgreich validiert werden. Die beiden miRNAs können der Vorhersage des Metastasierungsrisikos dienen. Damit könnte es möglich sein, das individuelle metastatische Risiko genauer zu definieren als in den derzeit verwendeten klinischen prognostischen Scores. Da Sensitivität und Spezifität der einzelnen miRNAs jedoch nicht ausreichend präzise erscheinen, sollte die Kombination mit weiteren miRNAs geprüft werden.

Die Metastasierung stellt einen sehr komplexen Prozess dar. Daher ist es notwendig, die miRNAs nicht als einzelne Marker zu betrachten. Vielmehr sollte eine miRNA-Signatur entwickelt werden, um ein Vorhersagemodell für das Metastasierungsrisiko zu erstellen. Um dieses zu generieren, sollten in zukünftigen Studien die 14 Kandidaten-miRNAs aus den vorangegangenen Microarray-Analysen der Arbeitsgruppe gemeinsam betrachtet werden. Durch die Erstellung eines Vorhersagemodells könnte das individuelle Metastasierungsrisiko genauer definiert werden und somit die bestehenden Scores zur Prognoseerhebung ergänzt oder gar abgelöst werden. Somit wäre es möglich, dass die Patienten in der jeweiligen Risikogruppe bereits bei der Diagnosestellung eine personalisierte Therapie erhalten.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob die miRNA-Expression in bestimmten Tumorarealen eine veränderte Expression aufweisen. Bezugnehmend auf die intratumorale Heterogenität sollte die Validierung der beiden miRNAs (miR-30e-3p sowie miR-139-5p) an einer unabhängigen Kohorte untersucht werden.

Auch könnte die Wiederherstellung dysregulierter miRNAs neue therapeutische Angriffspunkte hervorbringen. Die unterschiedlichen Expressionen von miRNAs in Tumorgewebe, Serum/Plasma und Urin machen miRNAs zu attraktiven molekularen Biomarkern für Diagnose und Prognosebewertung. Deshalb sollte die prognostische Aussagekraft auch in weiteren biologischen Materialien wie Urin und Serum verifiziert werden. Dies würde im klinischen Alltag eine weniger invasive Diagnostik ermöglichen.

Weiterhin sind die miRNAs an verschiedenen pathogenetischen Mechanismen bei Entwicklung eines kNZK beteiligt. Bei der Validierung der möglichen Targets konnte Cofilin als mögliches Target der miR-30-Familie identifiziert werden. Obwohl die Ergebnisse zeigen, dass die miR-30-Familie direkt in bestimmte Signalwege eingreift, muss die genaue Funktion im Rahmen der Metastasierung noch geklärt werden. Außerdem sollten weitere Targets validiert werden. Somit könnten potentielle Angriffsziele für zukünftige Therapiestrategien identifiziert werden.

Insgesamt handelte es sich bei dieser Studie um einen retrospektiven Ansatz. Daher sollten prospektive Studien an einem größeren unabhängigen Patientenkollektiv vorgenommen werden, um die klinische Relevanz dieser beiden miRNAs bzw. der 14 Kandidaten- miRNAs zu bestätigen.

8 Verzeichnisse

8.1 Literatur- und Quellenverzeichnis

Acunzo, Mario, Giulia Romano, Dorothee Wernicke, and Carlo M. Croce
2015 MicroRNA and Cancer – A Brief Overview. *Advances in Biological Regulation* 57. 55th Symposium Issue: 1–9.

Algaba, Ferran, Hideyuki Akaza, Antonio López-Beltrán, et al.
2011 Current Pathology Keys of Renal Cell Carcinoma. *European Urology* 60(4): 634–643.

Amann, Kerstin, Renate Kain, Günter Klöppel, and Hans Kreipe
2016 *Pathologie Urogenitale Und Endokrine Organe, Gelenke Und Skelett*. 3. Springer.

Ärzteblatt, Deutscher Ärzteverlag GmbH, Redaktion Deutsches
N.d. Nivolumab Und Cabozantinib: Zwei Neue Wirkstoffe Bei... (28.09.2015).
<https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/64298/Nivolumab-und-Cabozantinib-Zwei-neue-Wirkstoffe-bei-Nierenkrebs-wirksam>, accessed March 18, 2017.

Azeem, Katerina, Helena Kollarova, Dagmar Horakova, Silvie Magnuskova, and Vladimir Janout
2011 Genetic Syndromes Associated with Renal Cell Carcinoma: A Review. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia* 155(3): 231–238.

Bamias, Aristotelis, Alexandra Karadimou, Sofia Lampaki, et al.
2010 Prognostic Stratification of Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma Treated with Sunitinib: Comparison with the Memorial Sloan-Kettering Prognostic Factors Model. *BMC Cancer* 10: 45.

Bao, Wei, Hai–Jing Fu, Qiao–Sheng Xie, et al.
2011 HER2 Interacts With CD44 to Up-Regulate CXCR4 via Epigenetic Silencing of MicroRNA-139 in Gastric Cancer Cells. *Gastroenterology* 141(6): 2076-2087.e6.

Bäumer, Rolf
2008 *Onkologische Pflege*. Georg Thieme Verlag.

Butz, Henriett, Peter M. Szabó, Roy Nofech-Mozes, et al.
2014 Integrative Bioinformatics Analysis Reveals New Prognostic Biomarkers of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clinical Chemistry* 60(10): 1314–1326.

Cairns, Paul
2011 Renal Cell Carcinoma. *Cancer Biomarkers* 9(1–6): 461–473.

Calin, George A., and Carlo M. Croce

2006 MicroRNA Signatures in Human Cancers. *Nature Reviews. Cancer* 6(11): 857–866.

Calin, George Adrian, Cinzia Sevignani, Calin Dan Dumitru, et al.

2004 Human MicroRNA Genes Are Frequently Located at Fragile Sites and Genomic Regions Involved in Cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(9): 2999–3004.

Chow, Wong-Ho, Linda M. Dong, and Susan S. Devesa

2010 Epidemiology and Risk Factors for Kidney Cancer. *Nature Reviews. Urology* 7(5): 245–257.

Colt, Joanne S., Kendra Schwartz, Barry I. Graubard, et al.

2011 HYPERTENSION AND RISK OF RENAL CELL CARCINOMA AMONG WHITE AND BLACK AMERICANS. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 22(6): 797–804.

Dabestani, Saeed, Andreas Thorstenson, Per Lindblad, et al.

2016 Renal Cell Carcinoma Recurrences and Metastases in Primary Non-Metastatic Patients: A Population-Based Study. *World Journal of Urology* 34(8): 1081–1086.

Davis-Dusenbery, Brandi N., and Akiko Hata

2010 MicroRNA in Cancer. *Genes & Cancer* 1(11): 1100–1114.

Dillon, Laura W, Allison A Burrow, and Yuh-Hwa Wang

2010 DNA Instability at Chromosomal Fragile Sites in Cancer. *Current Genomics* 11(5): 326–337.

Djuranovic, Sergej, Ali Nahvi, and Rachel Green

2011 A Parsimonious Model for Gene Regulation by MiRNAs. *Science* 331(6017): 550–553.

Eisenreich, Andreas

2009 Differenzielle Regulation Des Zytokin- Induzierten Alternativen Spleißens Des TF Gens in Humanen Endothelzellen.

Esquela-Kerscher, Aurora, and Frank J. Slack

2006 Oncomirs — MicroRNAs with a Role in Cancer. *Nature Reviews Cancer* 6(4): 259–269.

F, Parodi, Carosio R, Ragusa M, et al.

2016 Epigenetic Dysregulation in Neuroblastoma: A Tale of MiRNAs and DNA Methylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1859(12): 1502–1514.

Fasolo, Angelica, and Cristiana Sessa

2008 MTOR Inhibitors in the Treatment of Cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 17(11): 1717–1734.

Fedorko, Michal, Dalibor Pacik, Roman Wasserbauer, et al.

2015 MicroRNAs in the Pathogenesis of Renal Cell Carcinoma and Their Diagnostic and Prognostic Utility as Cancer Biomarkers. *The International Journal of Biological Markers*: 0–0.

Fritz, Helena K. M., David Lindgren, Börje Ljungberg, Håkan Axelson, and Björn Dahlbäck
2014 The MiR(21/10b) Ratio as a Prognostic Marker in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *European Journal of Cancer* (Oxford, England: 1990) 50(10): 1758–1765.

Fu, Qiang, Zheng Liu, Deng Pan, et al.

2014 Tumor MiR-125b Predicts Recurrence and Survival of Patients with Clear-Cell Renal Cell Carcinoma after Surgical Resection. *Cancer Science* 105(11): 1427–1434.

Guess, Martin G., Kristen K. B. Barthel, Brooke C. Harrison, and Leslie A. Leinwand

2015 MiR-30 Family MicroRNAs Regulate Myogenic Differentiation and Provide Negative Feedback on the MicroRNA Pathway. *PLoS ONE* 10(2).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4331529/>, accessed February 21, 2018.

Ha, Minju, and V. Narry Kim

2014 Regulation of MicroRNA Biogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15(8): 509–524.

Haas, Naomi B, Judith Manola, Robert G Uzzo, et al.

2016 Adjuvant Sunitinib or Sorafenib for High-Risk, Non-Metastatic Renal-Cell Carcinoma (ECOG-ACRIN E2805): A Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomised, Phase 3 Trial. *Lancet* (London, England) 387(10032): 2008–2016.

Haas, Naomi B., and Katherine L. Nathanson

2014 Hereditary Kidney Cancer Syndromes. *Advances in Chronic Kidney Disease* 21(1): 81–90.

Heinzelmann, Joana, André Unrein, Ulrike Wickmann, et al.

2014 MicroRNAs with Prognostic Potential for Metastasis in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: A Comparison of Primary Tumors and Distant Metastases. *Annals of Surgical Oncology* 21(3): 1046–1054.

Heng, Daniel Y C, Wanling Xie, Meredith M Regan, et al.

2013 External Validation and Comparison with Other Models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium Prognostic Model: A Population-Based Study. *The Lancet. Oncology* 14(2): 141–148.

Herold, Gerd

2016 *Innere Medizin*.

Hertzberg, Barbara S., and William D. Middleton

2015 *Ultrasound: The Requisites*. Elsevier Health Sciences.

Hiroki, Eri, Jun-Ichi Akahira, Fumihiko Suzuki, et al.

2010 Changes in MicroRNA Expression Levels Correlate with Clinicopathological Features and Prognoses in Endometrial Serous Adenocarcinomas. *Cancer Science* 101(1): 241–249.

Hodorová, I., S. Rybárová, P. Solár, et al.

2008 Multidrug Resistance Proteins in Renal Cell Carcinoma. *Folia Biologica* 54(6): 187–192.

Hsieh, Wen-Tsong, Ke-Rung Tzeng, Jin-Shuei Ciou, et al.

2015 Transcription Factor and MicroRNA-Regulated Network Motifs for Cancer and Signal Transduction Networks. *BMC Systems Biology* 9(Suppl 1): S5.

Huang, Ling-Li, Ling-Wei Huang, Lei Wang, et al.

2017 Potential Role of MiR-139-5p in Cancer Diagnosis, Prognosis and Therapy. *Oncology Letters* 14(2): 1215–1222.

Hurst, Douglas R., Mick D. Edmonds, and Danny R. Welch

2009 Metastamir - the Field of Metastasis-Regulatory MicroRNA Is Spreading. *Cancer Research* 69(19): 7495–7498.

Ishihara, Tomoaki, Naohiko Seki, Satoru Inoguchi, et al.

2014 Expression of the Tumor Suppressive MiRNA-23b/27b Cluster Is a Good Prognostic Marker in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *The Journal of Urology* 192(6): 1822–1830.

Jeltsch, Michael, Veli-Matti Leppänen, Pipsa Saharinen, and Kari Alitalo

2013 Receptor Tyrosine Kinase-Mediated Angiogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(9). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3753715/>, accessed March 18, 2017.

Juan, David, Gabriela Alexe, Travis Antes, et al.

2010 Identification of a MicroRNA Panel for Clear-Cell Kidney Cancer. *Urology* 75(4): 835–841.

Karakiewicz, Pierre I., Maxine Sun, Joaquin Bellmunt, Vesna Sneller, and Bernard Escudier

2011 Prediction of Progression-Free Survival Rates After Bevacizumab Plus Interferon Versus Interferon Alone in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma: Comparison of a Nomogram to the Motzer Criteria. *European Urology* 60(1): 48–56.

Khella, Heba W. Z., Andreas Scorilas, Roy Mozes, et al.

2015 Low Expression of MiR-126 Is a Prognostic Marker for Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *The American Journal of Pathology* 185(3): 693–703.

Ko, Jenny J., Wanling Xie, Nils Kroeger, et al.

2015 The International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium Model as a Prognostic Tool in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Previously Treated with First-Line Targeted Therapy: A Population-Based Study. *The Lancet. Oncology* 16(3): 293–300.

Kohlhapp, Frederick J., Anirban K. Mitra, Ernst Lengyel, and Marcus E. Peter

2015 MicroRNAs as Mediators and Communicators between Cancer Cells and the Tumor Micro-Environment. *Oncogene* 34(48): 5857–5868.

Kong, Yi W, David Ferland-McCollough, Thomas J Jackson, and Martin Bushell
2012 MicroRNAs in Cancer Management. *The Lancet Oncology* 13(6): e249–e258.

Krishnan, Keerthana, Anita L. Steptoe, Hilary C. Martin, et al.
2013 MiR-139-5p Is a Regulator of Metastatic Pathways in Breast Cancer. *RNA* 19(12): 1767–1780.

Kurosch, Dr M., M. Reiter, and A. Haferkamp
2014 Epidemiologie, Diagnostik und chirurgische Therapie des Nierenzellkarzinoms. *Der Onkologe* 20(9): 899–910.

Lane, Brian R., and Inderbir S. Gill
2010 7-Year Oncological Outcomes after Laparoscopic and Open Partial Nephrectomy. *The Journal of Urology* 183(2): 473–479.

Lee, Heejeong, Chul Soo Park, Georgios Dftereos, et al.
2012 MicroRNA Expression in Ovarian Carcinoma and Its Correlation with Clinicopathological Features. *World Journal of Surgical Oncology* 10: 174.

Leibovich, Bradley C., Christine M. Lohse, Paul L. Crispen, et al.
2010 Histological Subtype Is an Independent Predictor of Outcome for Patients With Renal Cell Carcinoma. *The Journal of Urology* 183(4): 1309–1316.

Leitlinienprogramm Onkologie - S3 Leitlinie Nierenzellkarzinom
2017. awmf. <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/043-017OL.html>, accessed March 26, 2017.

Li, H., J. Zhao, J. W. Zhang, et al.
2013 MicroRNA-217, down-Regulated in Clear Cell Renal Cell Carcinoma and Associated with Lower Survival, Suppresses Cell Proliferation and Migration. *Neoplasma* 60(5): 511–515.

Li, Qingguo, Xin Liang, Yuwei Wang, et al.
2016 MiR-139-5p Inhibits the Epithelial-Mesenchymal Transition and Enhances the Chemotherapeutic Sensitivity of Colorectal Cancer Cells by Downregulating BCL2. *Scientific Reports* 6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4886683/>, accessed July 14, 2018.

Liu, Ran, Miao Yang, Yanli Meng, et al.
2013 Tumor-Suppressive Function of MiR-139-5p in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE* 8(10). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3799985/>, accessed May 13, 2018.

Ljungberg, Borje, Karim Bensalah, Steven Canfield, et al.
2015 EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma: 2014 Update. *European Urology* 67(5): 913–924.

Ljungberg, Börje, Steven C. Campbell, Han Yong Cho, et al.

2011 The Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *European Urology* 60(4): 615–621.

Llungberg, B., L. Albiges, K. Bensalah, et al.

2017 EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma. European Association of Urology.

https://uroweb.org/wp-content/uploads/10-Renal-Cell-Carcinoma_2017_web.pdf, accessed August 16, 2018.

Lopez-Camarillo, Cesar, Laurence A. Marchat, Elena Arechaga-Ocampo, et al.

2012 MetastamiRs: Non-Coding MicroRNAs Driving Cancer Invasion and Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences* 13(2): 1347–1379.

Lujambio, Amaia, and Scott W. Lowe

2012 The Microcosmos of Cancer. *Nature* 482(7385): 347–355.

Luo, Hua-Nan, Zheng-Hui Wang, Ying Sheng, et al.

2014 MiR-139 Targets CXCR4 and Inhibits the Proliferation and Metastasis of Laryngeal Squamous Carcinoma Cells. *Medical Oncology (Northwood, London, England)* 31(1): 789.

Masoud, Georgina N., and Wei Li

2015 HIF-1 α Pathway: Role, Regulation and Intervention for Cancer Therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 5(5): 378–389.

Miles, Gregory D, Michael Seiler, Lorna Rodriguez, Gunaretnam Rajagopal, and Gyan Bhanot

2012 Identifying MicroRNA/MRNA Dysregulations in Ovarian Cancer. *BMC Research Notes* 5: 164.

Mlcochova, Hana, Tana Machackova, Anja Rabien, et al.

2016 Epithelial-Mesenchymal Transition-Associated MicroRNA/MRNA Signature Is Linked to Metastasis and Prognosis in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Scientific Reports* 6: 31852.

Moch, H.

2016a WHO-Klassifikation von 2016 und erste S3-Leitlinie zum Nierenzellkarzinom. *Der Pathologe* 37(2): 127–133.

2016b WHO-ISUP-Graduierungssystem für Nierenkarzinome. *Der Pathologe*: 1–6.

Mogilyansky, E., and I. Rigoutsos

2013 The MiR-17/92 Cluster: A Comprehensive Update on Its Genomics, Genetics, Functions and Increasingly Important and Numerous Roles in Health and Disease. *Cell Death & Differentiation* 20(12): 1603–1614.

Motzer, R. J., T. E. Hutson, P. Tomczak, et al.

2009 Overall Survival and Updated Results for Sunitinib Compared With Interferon Alfa in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 27(22): 3584–3590.

Motzer, Robert J., Naomi B. Haas, Frede Donskov, et al.
2017 Randomized Phase III Trial of Adjuvant Pazopanib versus Placebo after Nephrectomy in Patients with Locally Advanced Renal Cell Carcinoma (RCC) (PROTECT). *Journal of Clinical Oncology* 35(15_suppl): 4507–4507.

Mueller, Daniel W., Michael Rehli, and Anja K. Bosserhoff
2009 MiRNA Expression Profiling in Melanocytes and Melanoma Cell Lines Reveals MiRNAs Associated with Formation and Progression of Malignant Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* 129(7): 1740–1751.

Muglia, Valdair F., and Adilson Prando
2015 Renal Cell Carcinoma: Histological Classification and Correlation with Imaging Findings. *Radiologia Brasileira* 48(3): 166–174.

Nathan, Paul D., and Tim G. Eisen
2002 The Biological Treatment of Renal-Cell Carcinoma and Melanoma. *The Lancet. Oncology* 3(2): 89–96.

Ng, Chuan S., Christopher G. Wood, Paul M. Silverman, et al.
2008 Renal Cell Carcinoma: Diagnosis, Staging, and Surveillance. *American Journal of Roentgenology* 191(4): 1220–1232.

Nooter, K., and G. Stoter
1996 Molecular Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Pathology, Research and Practice* 192(7): 768–780.

Ostrowska, Zofia, and Joanna Moraczewska
2017 Cofilin - a Protein Controlling Dynamics of Actin Filaments. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)* 71(0): 339–351.

Palapattu, Ganesh S, Blaine Kristo, and Jacob Rajfer
2002 Paraneoplastic Syndromes in Urologic Malignancy: The Many Faces of Renal Cell Carcinoma. *Reviews in Urology* 4(4): 163–170.

Pathology of Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Definition, Epidemiology, Etiology
2016. <http://emedicine.medscape.com/article/1612043-overview>, accessed May 22, 2016.

Pesch, B., J. Haerting, U. Ranft, et al.
2000 Occupational Risk Factors for Renal Cell Carcinoma: Agent-Specific Results from a Case-Control Study in Germany. MURC Study Group. Multicenter Urothelial and Renal Cancer Study. *International Journal of Epidemiology* 29(6): 1014–1024.

Pichler, M., G. C. Hutterer, C. Stoeckigt, et al.
2013 Validation of the Pre-Treatment Neutrophil-Lymphocyte Ratio as a Prognostic Factor in a Large European Cohort of Renal Cell Carcinoma Patients. *British Journal of Cancer* 108(4): 901–907.

Port, F. K., N. E. Ragheb, A. G. Schwartz, and V. M. Hawthorne

1989 Neoplasms in Dialysis Patients: A Population-Based Study. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation* 14(2): 119–123.

Quail, DF, and JA Joyce

2013 Microenvironmental Regulation of Tumor Progression and Metastasis. *Nature Medicine* 19(11): 1423–1437.

Ravaud, Alain, Robert J. Motzer, Hardev S. Pandha, et al.

2016 Adjuvant Sunitinib in High-Risk Renal-Cell Carcinoma after Nephrectomy. *New England Journal of Medicine* 375(23): 2246–2254.

Real-Time PCR

N.d. <http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=real-time-pcr-qpcr>, accessed July 23, 2016.

Renehan, Andrew G., Margaret Tyson, Matthias Egger, Richard F. Heller, and Marcel Zwahlen

2008 Body-Mass Index and Incidence of Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Observational Studies. *Lancet (London, England)* 371(9612): 569–578.

Rini, Brian I., and Michael B. Atkins

2009 Resistance to Targeted Therapy in Renal-Cell Carcinoma. *The Lancet. Oncology* 10(10): 992–1000.

Rink, M., F. K. H. Chun, B. Robinson, et al.

2011 Tissue-Based Molecular Markers for Renal Cell Carcinoma. *Minerva Urologica E Nefrologica = The Italian Journal of Urology and Nephrology* 63(4): 293–308.

Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft, and der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg)

2017 Krebs in Deutschland Für 2013/2014. 11. Robert Koch Institut.

Sakamoto, Shuji, Kazuma Aoki, Takuma Higuchi, et al.

2009 The NF90-NF45 Complex Functions as a Negative Regulator in the MicroRNA Processing Pathway. *Molecular and Cellular Biology* 29(13): 3754–3769.

Sand, M., M. Skrygan, D. Sand, et al.

2012 Expression of MicroRNAs in Basal Cell Carcinoma. *The British Journal of Dermatology* 167(4): 847–855.

Sarto, C., A. Marocchi, J. C. Sanchez, et al.

1997 Renal Cell Carcinoma and Normal Kidney Protein Expression. *Electrophoresis* 18(3–4): 599–604.

Schepeler, T., A. Holm, P. Halvey, et al.

2012 Attenuation of the Beta-Catenin/TCF4 Complex in Colorectal Cancer Cells Induces Several Growth-Suppressive MicroRNAs That Target Cancer Promoting Genes. *Oncogene* 31(22): 2750–2760.

Schulz, Jörg B.
2011 Neurologie...in 5 Tagen. Springer-Verlag.

Schütt, Christine, and Barbara Bröker
2011 Grundwissen Immunologie. Springer-Verlag.

Shu, X, M A Hildebrandt, J Gu, et al.
2017 MicroRNA Profiling in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Tissues Potentially Links Tumorigenesis and Recurrence with Obesity. *British Journal of Cancer* 116(1): 77–84.

Silva, J., V. García, Á Zaballos, et al.
2011 Vesicle-Related MicroRNAs in Plasma of Nonsmall Cell Lung Cancer Patients and Correlation with Survival. *European Respiratory Journal* 37(3): 617–623.

Sivaramakrishna, B., Narmada P. Gupta, Pankaj Wadhwa, et al.
2005 Pattern of Metastases in Renal Cell Carcinoma: A Single Institution Study. *Indian Journal of Cancer* 42(4): 173–177.

Slaby Ondrej, Redova Martina, Poprach Alexandr, et al.
2012 Identification of MicroRNAs Associated with Early Relapse after Nephrectomy in Renal Cell Carcinoma Patients. *Genes, Chromosomes and Cancer* 51(7): 707–716.

Slezak-Prochazka, Izabella, Selvi Durmus, Bart-Jan Kroesen, and Anke van den Berg
2010 MicroRNAs, Macrocontrol: Regulation of MiRNA Processing. *RNA* 16(6): 1087–1095.

Song, Mingxu, Yuan Yin, Jiwei Zhang, et al.
2014 MiR-139-5p Inhibits Migration and Invasion of Colorectal Cancer by Downregulating AMFR and NOTCH1. *Protein & Cell* 5(11): 851–861.

Staderini, F., F. Cianchi, B. Badii, et al.
2015 A Unique Presentation of a Renal Clear Cell Carcinoma with Atypical Metastases. *International Journal of Surgery Case Reports* 11: 29–32.

Sun, Xueqing, Guangcun Cheng, Mingang Hao, et al.
2010 CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis and Cancer Progression. *Cancer Metastasis Reviews* 29(4): 709–722.

Tannir, Nizar M., Sumanta K. Pal, and Michael B. Atkins
2018 Second-Line Treatment Landscape for Renal Cell Carcinoma: A Comprehensive Review. *The Oncologist* 23(5): 540–555.

Tsai, Cheng-Han, Liang-Ting Lin, Chung-Yih Wang, et al.
2015 Over-Expression of Cofilin-1 Suppressed Growth and Invasion of Cancer Cells Is Associated with up-Regulation of Let-7 MicroRNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1852(5): 851–861.

Tumorregister München

2018 Nierenkarzinom - Inzidenz Und Mortalität. https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/bC64__G-ICD-10-C64-Nierenkarzinom- Inzidenz-und-Mortalitaet.pdf, accessed August 14, 2018.

Tumorspezifische Auswertungen Des Tumorregister München Am Tumorzentrum München N.d. https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/specific_analysis.php, accessed August 14, 2018.

Wang, Daya, Chao Zhu, Yifan Zhang, et al.

2017 MicroRNA-30e-3p Inhibits Cell Invasion and Migration in Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Targeting Snail1. *Oncology Letters* 13(4): 2053–2058.

Wang, KAI, JUNKAI WANG, JI SUN, et al.

2015 Renal Cell Carcinoma with Metachronous Metastasis to the Contralateral Adrenal Gland and Urinary Bladder: A Case Report. *Oncology Letters* 10(5): 2749–2752.

Wang, Weigang, Ghassan Mouneimne, Mazen Sidani, et al.

2006 The Activity Status of Cofilin Is Directly Related to Invasion, Intravasation, and Metastasis of Mammary Tumors. *The Journal of Cell Biology* 173(3): 395–404.

Wang, Yilin, Xiaolong Zhang, Chao Zou, et al.

2016 MiR-195 Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis through Modulating IRS1 in Breast Cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 80: 95–101.

Wang, Zhengqiang, Qianshan Ding, Yanxia Li, et al.

2016 Reanalysis of MicroRNA Expression Profiles Identifies Novel Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma Prognosis. *Tumor Biology* 37(11): 14779–14787.

Wiecek, Witold, and Helene Karcher

2016 Nivolumab versus Cabozantinib: Comparing Overall Survival in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *PLoS ONE* 11(6). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4894561/>, accessed March 18, 2017.

Wink, Michael

2011 Molekulare Biotechnologie: Konzepte, Methoden und Anwendungen. John Wiley & Sons.

Witkos, T.M, E Koscianska, and W.J Krzyzosiak

2011 Practical Aspects of MicroRNA Target Prediction. *Current Molecular Medicine* 11(2): 93–109.

Wittekind, Christian

2017 TNM: Klassifikation Maligner Tumoren. John Wiley & Sons.

Wu, Xiwei, Lihong Weng, Xuejun Li, et al.

2012 Identification of a 4-MicroRNA Signature for Clear Cell Renal Cell Carcinoma Metastasis and Prognosis. *PLoS ONE* 7(5). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3356334/>, accessed May 13, 2018.

Xiao, Haibing, Jin Zeng, Heng Li, et al.

2015 MiR-1 Downregulation Correlates with Poor Survival in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Where It Interferes with Cell Cycle Regulation and Metastasis. *Oncotarget* 6(15): 13201–13215.

Xing, Tianying, and Huiying He

2016 Epigenomics of Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Potential Use in Molecular Pathology. *Chinese Journal of Cancer Research* 28(1): 80–91.

Yoshino, H, T Chiyomaru, H Enokida, et al.

2011 The Tumour-Suppressive Function of MiR-1 and MiR-133a Targeting TAGLN2 in Bladder Cancer. *British Journal of Cancer* 104(5): 808–818.

Youssef, Youssef M., Nicole M. A. White, Jörg Grigull, et al.

2011 Accurate Molecular Classification of Kidney Cancer Subtypes Using MicroRNA Signature. *European Urology* 59(5): 721–730.

Zaman, Mohd Saif, Varahram Shahryari, Guoren Deng, et al.

2012 Up-Regulation of MicroRNA-21 Correlates with Lower Kidney Cancer Survival. *PloS One* 7(2): e31060.

Znaor, Ariana, Joannie Lortet-Tieulent, Mathieu Laversanne, Ahmedin Jemal, and Freddie Bray

2015 International Variations and Trends in Renal Cell Carcinoma Incidence and Mortality. *European Urology* 67(3): 519–530.

Zugor, Vahudin, Apostolos P. Labanaris, Berthold Lausen, Lausen Berthold, and Günter E. Schott

2008 Inferior Vena Cava Involvement in Renal Cell Carcinoma: Comparison of Survival Rates between Patients with Thrombus and Infiltration. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 42(1): 35–39.

8.2 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Absolute Zahlen der Neuerkrankungs- und Sterbefälle in Deutschland nach Geschlecht in den Jahren 1999-2014/2015.....</i>	<i>8</i>
<i>Abbildung 2: Altersspezifische Erkrankungsraten nach Geschlecht aus den Jahren 2013 und 2014 auf 100.000 Einwohner in Deutschland.....</i>	<i>9</i>
<i>Abbildung 3: Makroskopie des kNZK.....</i>	<i>12</i>
<i>Abbildung 4: Mikroskopisches Bild eines kNZK nach HE-Färbung.....</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 5: Auszug aus der Verteilung der T-Stadien bei Erstdiagnose nach Geschlecht .</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 6: Angriffsziele der unterschiedlichen Therapeutika beim metastasierten NZK....</i>	<i>18</i>
<i>Abbildung 7: Schematische Darstellung der miRNA Biogenese.....</i>	<i>27</i>
<i>Abbildung 8: Schematische Darstellung des Argonautproteins.</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 9: Regulation der Tumorgenese durch miRNAs</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 10: Auflistung der Metastamirs, welche die unterschiedlichen Metastasierungsprozesse fördern bzw. inhibieren.</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 11: Proteomanalyse. Aus den Vorversuchen identifizierte miRNA-Zielgene mittels Proteomanalyse in der 2D-Elektrophorese.....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 12: Typischer RNA Peak bei einer Messung durch den NanoDrop™ Spectrophotometer.</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 13: Prinzip der Taq-Man Sonde.....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 14: Aufbau des Western Blots.....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 15: Vergleich der normalisierten Expressionswerte der miRNA miR-30e-3p zwischen Normalgeweben, nichtmetastasierten Tumoren sowie metastasierten Tumoren. .</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 16: Vergleich der normalisierten Expressionswerte zwischen Normalgeweben, nichtmetastasierten Tumoren sowie metastasierten Tumoren der miRNA miR-139-5p.....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 17: ROC-Kurve zur Ermittlung des Grenzwertes für die Unterscheidung von metastasierten und nichtmetastasierten Tumoren anhand der miRNA-Expression der beiden miRNAs miR-30e-3p und miR-139-5p.....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 18: Kaplan-Meier-Analyse zum metastasierungsfreien Überleben für die miRNA miR-30e-3p.....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 19: Kaplan-Meier-Analyse zum metastasierungsfreien Überleben die miRNA miR-139-5p</i>	<i>60</i>

<i>Abbildung 20: Gesamtüberlebenszeit für die unterschiedlichen Expressionslevel der miRNA miR-30e-3p.....</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 21: Gesamtüberlebenszeit für die unterschiedlichen Expressionslevel der miRNA miR-139-5p.....</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 22: Metastasierungsfreie Überlebenszeit der miRNA miR-30e-3p für organbegrenzte Tumoren der TNM-Kategorie T1 und T2</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 23: Metastasierungsfreie Überlebenszeit der miRNA miR-139-5p für organbegrenzte Tumoren der TNM-Kategorie T1 und T2</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 24: Gesamtüberlebenszeit für die unterschiedlichen Expressionslevel der miRNA miR-30e-3p bei organbegrenzten Tumoren</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 25: Gesamtüberlebenszeit für die unterschiedlichen Expressionslevel der miRNA miR-139-5p bei organbegrenzten Tumoren</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 26: Erster Vorversuch zur Überprüfung der transienten Transfektion von miR-30e-3p in der Zelllinie 786-O.....</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 27: Zweiter Vorversuch mit unterschiedlichen Konzentrationen an miRNA miR-30e-3p</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 28: Dritter Vorversuch zur Bestätigung der transienten Transfektion mit einer Konzentration von 0,5 µl miRNA miR-30e-3p.....</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 29: Expression der Targets für Cofilin (CFL) für die miRNA miR-30e-3p aus drei verschiedenen Transfektionen</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 30: Expression der Targets für NDK für die miRNA miR-30e-3p aus drei verschiedenen Transfektionen.....</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 31: Ergebnisse der Proteinkonzentrationsmessung für die Kandidaten-Proteine Cofilin und NDK.....</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 32: Relative Proteinmenge im Vergleich zwischen der Leerprobe (Mock), der Kontrollprobe (siRNA) und der mit miRNA-30-Familie transfizierten Probe (Mimic).....</i>	<i>74</i>

8.3 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: WHO-Klassifikation der verschiedenen Subtypen des NZK nach aktueller S3-Leitlinie von 2016.....</i>	<i>11</i>
<i>Tabelle 2: pTNM-Kategorien und histopathologisches Grading des NZK.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabelle 3: UICC Stadieneinteilung des NZK</i>	<i>16</i>
<i>Tabelle 4: Graduierungssystem der ISUP für NZK.....</i>	<i>17</i>
<i>Tabelle 5: Erst- und Zweitlinientherapie des metastasierten NZK.</i>	<i>20</i>
<i>Tabelle 6: MSKCC-Kriterien zur Prognosebewertung beim metastasierten NZK.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 7: IMDC-Kriterien zur Prognosebewertung beim metastasierten kNZK.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 8: Tumorspezifisches Überleben von chirurgisch behandelten Patienten der verschiedenen Subtypen des NZK.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 9: Relatives 5-Jahres-Überleben für Patienten mit NZK nach UICC</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 10: Modelle zur Prognosebewertung beim metastasierten NZK mit unterschiedlichen eingesetzten Variablen</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 11: 2-Jahres-Gesamtüberleben bei Patienten mit zielgerichteter Systemtherapie anhand der IMCD-Klassifikation.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 12: 14 Kandidaten-miRNAs aus FFPE-Gewebeproben von 33 Primärtumoren des kNZK. Es werden dabei die Expressionsunterschiede zwischen metastasierten bzw. nichtmetastasierten Primärtumoren verglichen (Quelle: Heinzelmann et al. 2014).....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 13: Klinische und histopathologische Übersicht der verwendeten Gewebeproben. .</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 14: Spezifische Sequenzen der miRNA-Primer.</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 15: Beispiel zur Herstellung eines Primerpools.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 16: Reaktionsansatz zur cDNA Herstellung pro Probe.</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 17: Programm des Thermocyclers.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 18: PCR-Mastermixansatz.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 19: Amplifikationszyklus der qPCR.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 20: Rezept für zwei Minigele</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 21: Definierte Signifikanzlevel</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 22: Effizienzen der verwendeten Primer für die miRNA miR-30e-3p und miR-139-5p sowie für die Referenz RNU48.....</i>	<i>54</i>

<i>Tabelle 23: Zusammenfassung der Ergebnisse der miRNA miR-30e-3p aus den C_T-Werten der qPCR-Analyse.</i>	56
<i>Tabelle 24: Zusammenfassung der Ergebnisse der miRNA miR-139-5p aus den C_T-Werten der q-PCR-Analyse.</i>	57
<i>Tabelle 25: Mittels ROC-Analyse ermittelte Werte zum Vergleich der Metastasierungsergebnisse von metastasierten und nichtmetastasierten Tumoren.</i>	58
<i>Tabelle 26: Medianes metastasierungsfreies Überleben in Abhängigkeit von der miR-30e-3p-Expression.</i>	60
<i>Tabelle 27: Medianes metastasierungsfreies Überleben in Abhängigkeit von der miR-139-5p-Expression.</i>	61
<i>Tabelle 28: Medianes metastasierungsfreies Überleben in Abhängigkeit von der miR-30e-3p-Expression für organbegrenzte Tumoren.</i>	65
<i>Tabelle 29: Medianes metastasierungsfreies Überleben in Abhängigkeit von der miR-139-5p-Expression für organbegrenzte Tumoren.</i>	66
<i>Tabelle 30: Medianes Gesamtüberleben der unterschiedlichen miRNA miR-30e-3p-Expression für organbegrenzte Tumoren.</i>	67
<i>Tabelle 31: Medianes Gesamtüberleben der unterschiedlichen miRNA miR-139-5p-Expression für organbegrenzte Tumoren.</i>	68
<i>Tabelle 32: Erster Vorversuch mit einer Konzentration von 2 µl miRNA miR-30e-3p.</i>	69
<i>Tabelle 33: Zweiter Vorversuch mit Transfektionsansätzen unterschiedlicher Konzentration von miRNA miR-30e-3p.</i>	70
<i>Tabelle 34: Dritter Vorversuch mit einer Konzentration von 0,5 µl miRNA miR-30e-3p. Fold Change beim Vergleich der Mimic-Probe gegen die Mock-Probe.</i>	71
<i>Tabelle 35: Proteinkonzentration nach erfolgter Zelllyse.</i>	72

8.4 Abkürzungsverzeichnis

AUC	area under curve
BMI	Body-Mass-Index
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
Bzw.	Beziehungsweise
ccRCC	clear renal cell carcinoma
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DANN
CP-Wert	crossing point- Wert
CT	Computertomographie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotriol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al	und andere
FFPE	Formalin-fixed-paraffin-embedded
FKS	Fetales Kälberserum
FLCN	Folluculin-Gen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HE	Hämatoxylin-Eosin
kNZK	klarzelliges Nierenzellkarzinom
miRNA	Micro-Ribonukleinsäure
MOCK	Reagenz, welche nur mit Transfektionsreagenz versetzt wurde und somit eine „Scheintransfektion“ darstellt
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid

ND	NanoDrop
NDK	Nucleosid-Diphosphatkinase
NZK	Nierenzellkarzinom
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	potentia hydrogenii
PKD	Proteinase K Digestion Buffer
p-Wert	Signifikanzwert
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RBC	red blood cell
REST	Relative Expression Software Tool
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver operating characteristic
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TM	unregistered Trademark (nicht registrierter Markenname)
TNM	Tumor, Nodus, Metastasis
USA	United States of America
V.	Vena
Vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

9 Anhang

9.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit und auf dem Weg dorthin fachlich sowie persönlich unterstützt haben, ganz herzlich bedanken.

An erster Stelle gilt mein Dank Frau Prof. Dr. med. Kerstin Junker für die Vergabe dieses interessanten Themas und für ihre umfassende, konstruktive und engagierte Betreuung. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Joana Heinzelmann, die mir während der gesamten Arbeit aufmunternde Worte und Hilfestellungen entgegenbrachte.

Den Mitarbeitern des Molekularbiologischen Forschungslabors der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg danke ich für die herzliche Aufnahme in ihr Team und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Für Hilfestellungen jeglicher Art möchte ich mich insbesondere bei Dr. rer. nat. Sebastian Hölters und BTA Alexander Vogt bedanken.

Von ganzen Herzen möchte ich mich bei meiner Patentante Anne bedanken ohne deren liebevolle Unterstützung ein Medizinstudium und diese Arbeit nie möglich gewesen wären.

Der größte Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden. Ihr alle habt durch eure Geduld, euren Rückhalt und eure Motivation zum Gelingen dieser Arbeit und dem erfolgreichen Abschluss meines Studiums beigetragen. Danke, dass ihr immer für mich da seid, wenn ich euch brauche.